

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Identification et clonage d'une laccase chez un champignon acidophile

Guiguen, Allan

Award date:
2002

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



FACULTÉS UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR

Faculté des Sciences

Identification et clonage d'une laccase chez un champignon acidophile

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Allan Guiguen

Juin 2002

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix

FACULTE DES SCIENCES

Secrétariat du Département de Biologie

Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR

Téléphone : + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20

E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Identification et clonage d'une laccase chez un champignon acidophile

GUIGUEN Allan

Résumé

L'étude du bagage génétique acquis depuis l'apparition de la vie sur terre par les organismes extrémophiles suscite un intérêt grandissant pour la biologie tant fondamentale qu'appliquée. Ce travail pose la question de l'existence d'une laccase (oxydase à plusieurs atomes de cuivre susceptible de nombreuses applications biotechnologiques) et vise à cloner le gène correspondant en vue de son étude. L'utilisation des outils bio-informatiques appliqués aux gènes de laccase d'autres champignons a permis de dériver des amorces dégénérées pour cloner par PCR un fragment d'ADN génomique de 140 pb constituant une sonde autologue de laccase de *S. acidophilum*. Cette sonde marquée a été utilisée pour cribler une banque d'ADN génomique de *S. acidophilum* dans le but d'isoler le gène complet. Plusieurs cribles réalisés avec la sonde sur cette banque n'ont pas permis, à ce jour, le clonage du gène.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2002

Promoteur: Prof. J. Vanderlhaute

Je remercie le Professeur Jean Vandenhoute pour m'avoir offert la possibilité de faire ce mémoire au sein de son laboratoire ainsi que pour sa disponibilité et ses conseils avisés.

Je remercie les membres du jury, P. Boël, N. Dauchot, D. Fretin, et J. Remacle pour leur lecture critique et attentive de ce mémoire.

Je remercie particulièrement Isabelle Housen pour son apprentissage, ses explications, son flegme et son rire joyeux face au novice.

Je remercie le professeur Xavier De Bolle pour ses conseils savants ainsi que pour ses explications sur le dosage du café matinal.

Merci à Christophe Lambert pour son tact et son doigté pour retirer l'essence des milliards de données qui nous entourent.

Un grand merci à Nath pour sa prise en main, son aide précieuse et ses coups de gueule sympathiques.

Merci à Christian pour mes nombreuses pizzas tolérées au frigo, les diverses fumées, odeurs, chocolats et rafraîchissements apportés.

Merci à Dame Rose-Ma et Dame Monique pour leurs petites recettes, à Jean-Mi trop vite parti, à Régis pour ses dépannages et réponses précises.

Merci à tous les gens du laboratoire, qui d'une façon ou d'une autre, m'ont conseillé et répondu.

Je remercie tous les étudiants de deuxième licence pour le partage des moments de détente, de soutien et de difficulté.

Je remercie finalement mes parents qui, à la fois si loin et si proches, m'ont soutenu et m'ont permis de réaliser ces études épanouissantes.

Ce dernier remerciement va à une partie de moi qui m'a apporté réconfort, tendresse et amour pendant ces quatre petites années.

Abréviations

°C	Degré centigrade
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ddNTP	Didéoxyribonucléoside 5' triphosphate
dNTP	Déoxyribonucléoside 5' triphosphate
DO	Densité Optique
H	A,T,C : symboles pour un dATP ou dTTP ou dCTP
LB	Milieu de Luria-Bertani
min	Minute
N	A,C,G,T : symboles pour dATP, dCTP, dTTP , dGTP
pb	Paire de Bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
rpm	Révolutions par minute
UV	Ultra-Violet
W	A,T : dATP ou dTTP
X-Gal	5-bromo 4-chloro 3-indoyl, β Dgalactopyranoside.
Y	C,T : dTTP ou dCTP
T _m	Température de melting
aa	acide aminé
Amp	ampiciline
MCO	Multi Copper Oxydases
R	A,G : dATP ou dGTP

TABLE DES MATIERES



	1
TABLE DES MATIERES	5
INTRODUCTION	9
I. Avant-propos	10
II. Un champignon acidophile	11
II.1. Taxonomie et description	11
II.2. Caractéristiques physiologiques	11
III. L'enzyme bleue ou laccase	12
III.1. Historique et nomenclature	12
III.2. Activité	12
III.3. Participation des atomes de cuivre dans la réaction d'oxydation du substrat	13
III.4. Structure de l'enzyme	14
III.5. Rôles physiologiques	14
III.5.1. Lignification versus délignification	15
III.5.1.1. Paroi végétale	15
III.5.1.2. Lignification	16
III.5.1.3. Champignons et délignification	17
IV. Applications	19
OBJECTIFS ET STRATEGIE DU TRAVAIL	20
RESULTATS	22
I. Obtention d'une sonde	23
I.1. Alignements de séquences de laccase	23
I.1.1. Alignement général	23
I.1.2. Alignement des laccases de champignons	24
I.2. Détermination de couples d'amorces	25
I.2.1. Choix de boîtes conservées	25
I.2.2. Détermination des amorces et couples d'amorces 5' et 3' sur base des boîtes a et b	26
I.3. PCR à gradient de température	27
I.4. Clonage des amplicons	28
I.4.1. Clonage des fragments de x, y, z et w pb	28
I.4.2. Analyse des séquences des amplicons de x, y et w pb	28
I.4.2.2.	29
I.4.3. En conclusion	29
II. Utilisation de la sonde de laccase chez <i>S. acidophilum</i>	30
II.1. Southern-blot	30
II.1.1. Sonde	30
II.1.2. Hybridation en Southern-blot de la sonde sur l'ADN génomique de <i>S. acidophilum</i>	30
II.2. Description et validité de la banque	30

II.3.	Criblage de la banque d'ADN génomique	31
II.3.1.	Première tentative de clonage	31
II.3.1.1.	Criblage proprement dit	31
II.3.1.2.	Caractérisation des 24 clones criblés lors du deuxième étalement	32
II.3.1.3.	Recherche du gène de laccase au sein des plasmides recombinants	32
II.3.2.	Deuxième tentative de clonage	33
II.3.2.1.	Criblage proprement dit	33
II.3.2.2.	Caractérisation des candidats	34
II.3.3.	Conclusions d'ensemble des deux tentatives de clonage	34
CONCLUSION GENERALE ET DISCUSSION		35
MATERIEL ET METHODES		39
I. Milieux de culture et antibiotiques		40
I.1.	Milieu Luria Bertani (LB)	40
I.2.	Milieu SOC	40
I.3.	Milieu pour <i>Scytalidium acidophilum</i>	40
I.4.	Antibiotiques	41
II. Souches et plasmides		41
II.1.	Souche bactérienne : <i>E. coli</i> DH10B	41
II.2.	Plasmides	42
II.2.1.	pGEM-T Easy (Promega)	42
II.2.2.	pUC 19 (In VitroGene)	43
III. Techniques relatives au traitement de séquences protéiques		43
III.1.	Banque de données non redondante	43
III.2.	Programmes de recherche en banques de données	43
III.2.1.	BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)	43
III.2.2.	PURGE	43
III.3.	Programmes d'alignement multiple.	44
III.3.1.	CLUSTAL W	44
III.3.2.	MATCH-BOX	44
IV. Techniques relatives à l'ADN		45
IV.1.	Extraction de l'ADN génomique de champignon	45
IV.2.	Amplification d'ADN par PCR	46
IV.3.	Electrophorèse en gel d'agarose	47
IV.4.	Extraction de l'ADN à partir de gel	48
IV.5.	Réaction de ligation	50
IV.6.	Transformations de bactéries CaCl_2 compétentes	50
IV.7.	Test blanc bleu	51
IV.8.	Extraction d'ADN plasmidique	51
IV.8.1.	Minipréparation d'ADN plasmidique d' <i>E. coli</i>	51
IV.8.2.	Midipréparation d'ADN plasmidique d' <i>E. coli</i>	52
IV.9.	Restriction de l'ADN	53
IV.10.	Séquençage d'ADN	54
IV.11.	Analyse de l'ADN restreint par « Southern blot »	55
IV.11.1.	Restriction de l'ADN et Electrophorèse en gel d'agarose	55
IV.11.2.	Dénaturation et neutralisation	56
IV.11.3.	Transfert et immobilisation	56
IV.11.4.	Séchage et pré-hybridation de la membrane	56

IV.11.5.	Marquage et hybridation de la sonde	57
IV.11.6.	Lavages	57
IV.11.7.	Détection et révélation	58
IV.12.	Hybridation de sonde sur plasmide restreint	58
IV.13.	Crible d'une banque d'ADN génomique	58
BIBLIOGRAPHIE		61
ANNEXES		64

INTRODUCTION

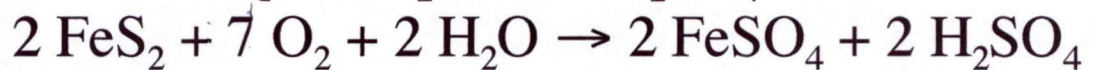


Figure 1 : Réactions énergétiques utilisées par une sulfobactérie acidophile

Sulfolobus est un chémolitotrophe aérobique qui oxyde le H_2S ou S° (soufre élémentaire) en H_2SO_4 et fixe le CO_2 comme seule source de carbone. Les réactions réalisées par cette archéobactérie hyperthermophile et acidophile sont reprises ci-dessus (D'après Madigan, Martinko *et al*, 2000).

I. Avant-propos

Par les voies de la génétique moléculaire et de la bio-informatique, l'isolement et l'étude de l'entière des gènes du vivant apparaissent possibles. Parmi ces gènes, les gènes d'organismes extrémophiles présentent un intérêt grandissant cautionné par le grand nombre d'applications potentielles qu'on leur découvre jour après jour.

La plupart des organismes extrémophiles sont des microorganismes, comprenant les archéobactéries, bactéries et microorganismes eucaryotes. Leur étude a permis d'aborder plusieurs questions fondamentales de la biologie dont celle de l'apparition de la vie sur terre, en suscitant à ce propos l'émergence de nouvelles idées ; ou encore les mécanismes et facteurs de la stabilité des protéines. En effet, la question de la relation entre la structure des protéines et leurs caractéristiques se pose en relation avec les propriétés de stabilité extraordinaire observées en milieu extrême.

En matière de recherche appliquée, l'obtention de protéines stables peut se concevoir selon deux types d'approche. Une première approche consiste à « adapter » les protéines à des conditions extrêmes de température, de pH ou de salinité grâce à l'ingénierie des protéines. Sur une base rationnelle, il s'agit donc d'une approche nécessitant la compréhension des mécanismes en jeu.

Une deuxième approche consiste à rechercher des protéines au sein d'organismes qui sont eux-mêmes adaptés à ces conditions d'extrémophilie. Dans ce cas, l'homme se base sur les adaptations naturelles réalisées par ces organismes au cours de l'évolution.

Dans le domaine industriel, la plupart des processus sont réalisés dans des conditions extrêmes de température ou de pH, ce qui justifie l'intérêt pour l'extrémophilie de certaines bactéries et champignons.

L'acidophilie en particulier est une branche assez peu explorée de l'extrémophilie ; seuls certains procaryotes tels les archéobactéries sulfo-oxydantes (*Sulfolobus solfataricus* : archéobactérie acidophile (optimum à pH 3) et hyperthermophile (optimum à 80°C)) ont fait l'objet d'études détaillées à ce sujet (figure 1).

Cependant, parmi les champignons ou fungi, on observe des espèces largement plus « tolérantes » aux environnements acides que ce que l'on observe chez les bactéries (Madigan, Martinko *et al.* 2000). De plus, les champignons sont des organismes de choix pour les enzymes. En effet, ces eucaryotes ont acquis un grand potentiel enzymatique au cours de leur évolution en rapport avec la diversité des milieux qu'ils colonisent avec succès.

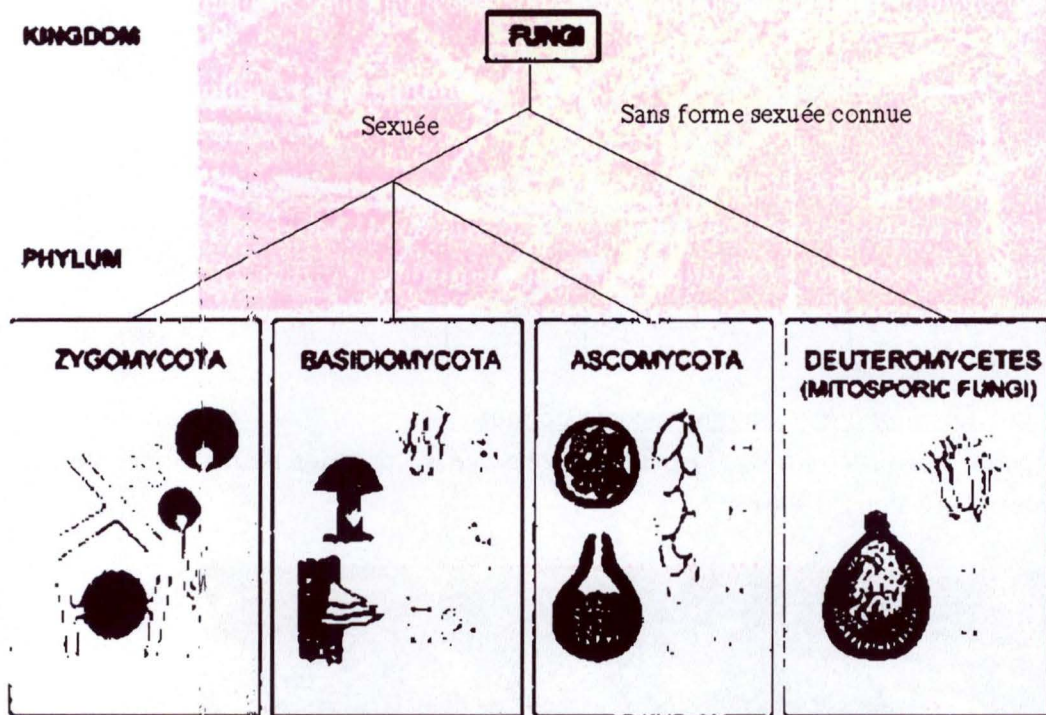


Figure 2 : Présentation schématique de la classification des *Deutéromycètes* au sein du règne des champignons (Adapté de Guarro, Gene *et al*, 1999).

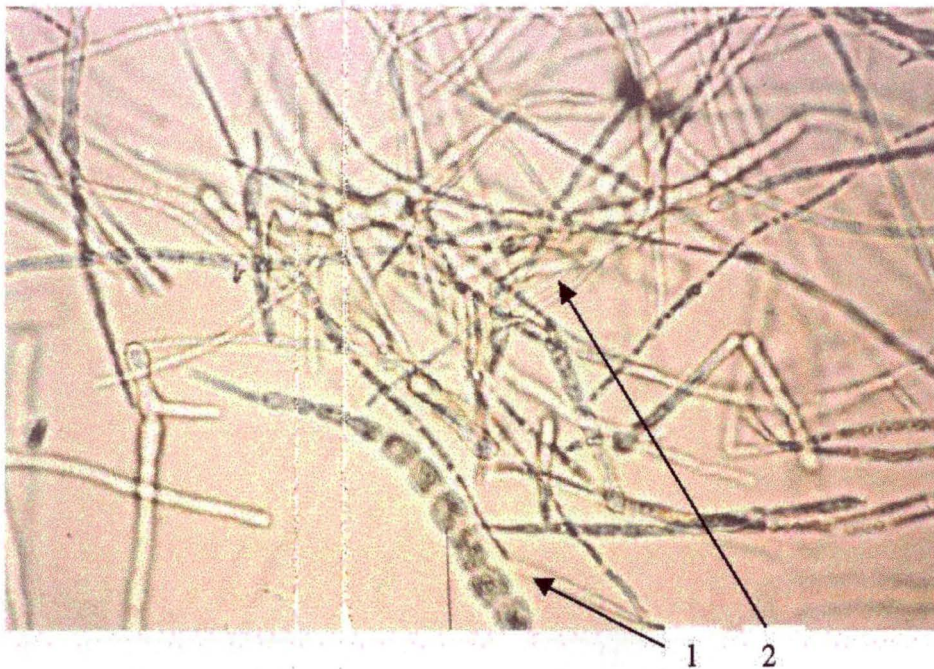


Figure 3a : *S. acidophilum* en microscopie optique

Un chapelet d'arthroconidies (1) peut être observé au premier plan entouré de myceliums segmentés (2) (Calculus, 1996).

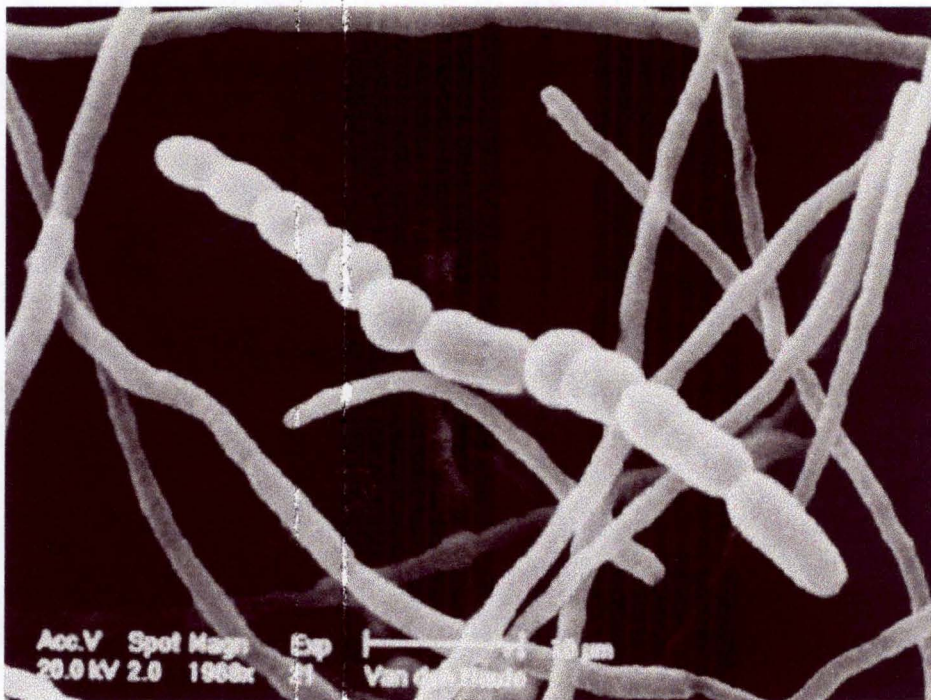


Figure 3b : *S. acidophilum* en microscopie électronique à balayage

Un chapelet d'arthroconidies peut à nouveau être observé au premier plan est entouré de myceliums segmentés (Calculus, 1996).

II. Un champignon acidophile

Ce champignon filamenteux vit dans le milieu géochimique particulier des mines d'uranium du Canada. Ce milieu est soumis à la production d'effluents de formations rocheuses acides qui sont caractérisés par un faible pH et une concentration élevée en sulfates et métaux dissous. Peu d'informations sont publiées à son sujet au plan biochimique et moléculaire.

II.1. Taxonomie et description

Le genre *Scytalidium* appartient au règne des *Champignons* de la division des *Ascomycètes mitosporiques*, de la classe des *Hyphomycètes*, de l'ordre des *Arthroconidiaceae* (Sigler and Carmichael 1973). *Ascomycète mitosporique*, deutéromycète ou encore champignon imparfait ou asexué sont autant de dénominations décrivant les champignons pour lesquels aucune forme sexuée n'est connue. Comme on ne peut se baser sur leurs caractéristiques sexuelles pour leur classification, ceux-ci sont regroupés par défaut, avec tous les champignons asexués, au sein du groupe des deutéromycètes (figure 2) (Guarro, Gene et al. 1999). Au sein du genre, cinq espèces sont répertoriées par le NCBI: *Scytalidium dimidiatum*, *hyalinum*, *lignicolum*, *thermophilum* et *vaccinii* auxquels il convient d'ajouter *S. acidophilum*.

Les seules divisions cellulaires connues de ce champignon sont donc de type mitotique.

La formation d'*arthroconidies* (spore de reproduction asexuée formée à partir de filaments particuliers se cloisonnant en cellules) se réalise par fragmentation du mycélium à l'intérieur duquel apparaissent des septums (figure 3 a, et 3 b).

Lorsque les spores (*arthroconidies*) deviennent des « spores de résistance » (transition liée à leur environnement), celles-ci sont appelées *clamidiospores*.

Ces spores se caractérisent par leur paroi mélanisée, très épaisse chez *S. acidophilum* au regard d'autres cellules de champignons, et l'apparition de pigments noirs cytoplasmiques responsables de la couleur noire du champignon en culture (Calculus 1996).

II.2. Caractéristiques physiologiques

Comme son nom l'indique, ce champignon est adapté aux environnements acides.

De plus, comme cela a été montré par un travail antérieur réalisé dans notre laboratoire, sa capacité de croître en présence de sciure de bois (Calculus 1996) met en évidence les dispositions de ce champignon acidophile à l'utilisation et la dégradation du bois. Les enzymes impliquées dans ce type de processus sont sécrétées et acido-résistantes.

Le large potentiel biotechnologique de cette batterie d'enzymes impliquées dans la dégradation du bois a suscité notre attention. L'actuel intérêt porté à l'une de ces enzymes nous a amené à l'étude d'une oxydase, la « laccase ».

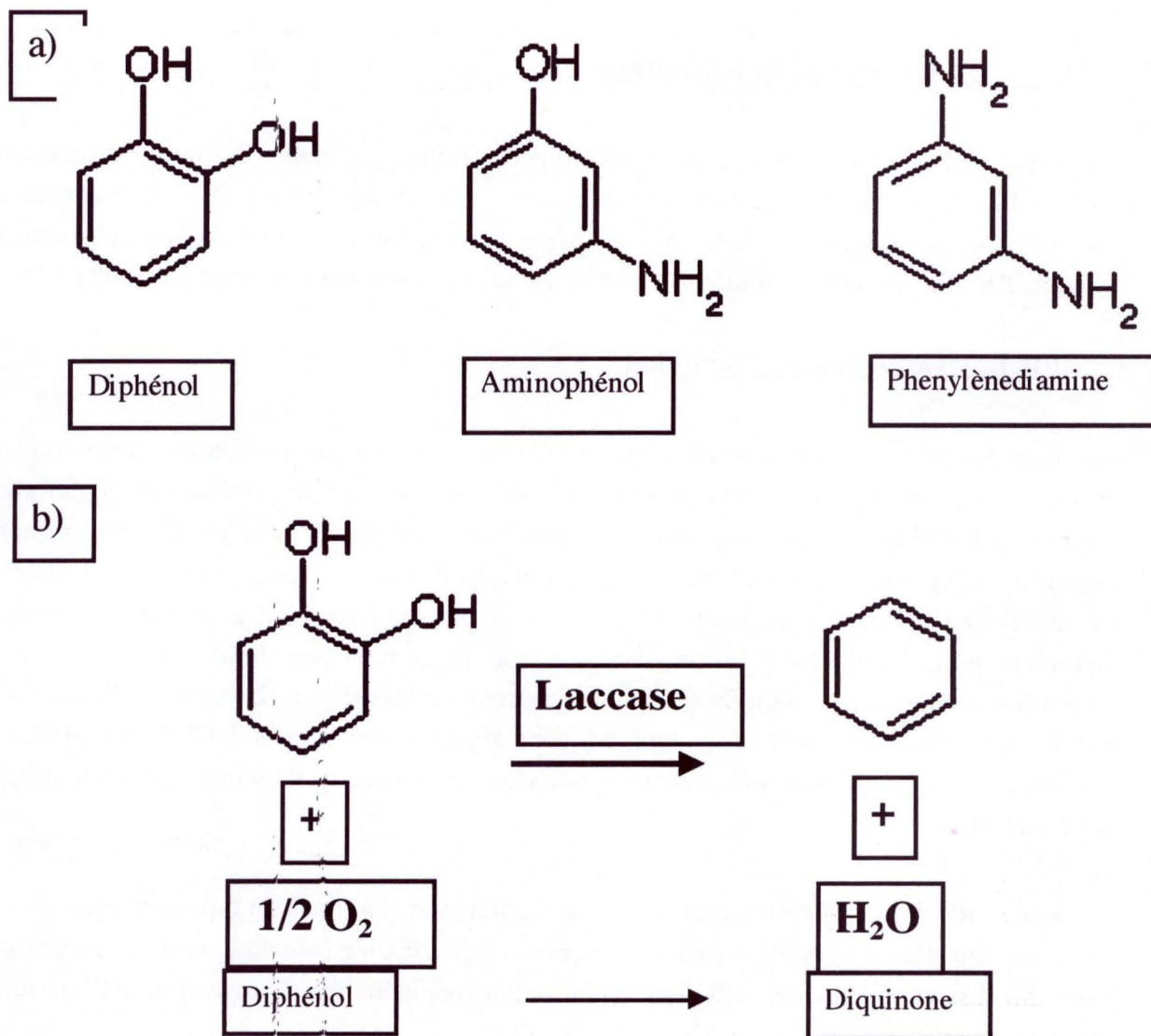


Figure 4 : Exemples de substrat (a) et type de réaction de la laccase (b)

Pour l'activité de la laccase, il s'agit d'un schéma modèle simple où la réduction de l' O_2 est couplée (par l'enzyme) à l'oxydation du diphénol en diquinone (Adapté de Griffith, Martinelli *et al*, 1994).

III. L'enzyme bleue ou laccase

III.1. Historique et nomenclature

Cette enzyme fut initialement étudiée par Yoshida en 1883 pour son implication dans le durcissement rapide au contact de l'air, de la résine de Sumac (*Rhus vernicifera* ou arbre à laque ; en anglais : Lacquer tree), arbre autochtone d'Asie de l'Est. Le catalyseur fut identifié et purifié plus de dix ans plus tard par Bertrand (1894) qui lui attribua le nom de « laccase ».

Les laccases de champignons furent, quant à elles, découvertes dans les années suivantes séparément par Bertrand (1896) et Labore (1896) puis fortement étudiées à partir des années septante (Call and Mücke 1997).

Les laccases :

- Nom systématique : benzènediol : oxygène oxydoréductase
- Autres noms : urishiol oxydase, p-diphenol oxydase
- Code attribué par la commission des enzymes : EC 1.10.3.2

E.C.1.-.- Oxydoréductases.

E.C.1.10.-.- Agissant sur les diphénols et composés dérivés comme donneur d'électrons.

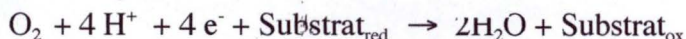
E.C.1.10.3.- Avec l'oxygène comme accepteur d'électrons.

E.C.1.10.3.2 Laccase.

III.2. Activité

Ces enzymes catalysent l'oxydation d'une variété de substrat par la réduction de l'oxygène moléculaire en eau selon l'équation redox ci-dessus.

Réaction générale : Laccase



Au contraire de la forte spécificité des enzymes en général, une propriété remarquable des laccases est leur large variété de substrat, parmi lesquels, les diphénols, aminophénols, polyphénols, polyamines, aryle diamines et quelques substrats inorganiques (figure 4) (Griffith, Martinelli *et al.* 1994) (KEGG, 2002)¹.

¹Bioinformatics Center, Institute for Chemical Research, Kyoto University ; <http://www.genome.ad.jp/kegg/>.

e⁻), induisant la formation de radicaux libres. Ces radicaux peuvent, par la suite, mener à des réactions non-enzymatiques ultérieures à l'oxydation.

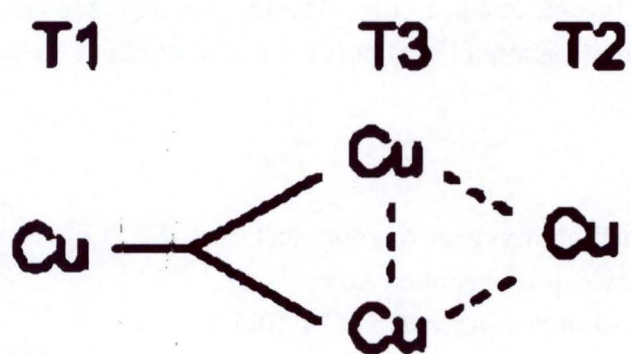


Figure 5 : Les ions cuivre au sein de la laccase
(D'après Torres and Wilson, 1999).

Ces réactions peuvent aboutir, par exemple, à la formation de polymère. (Call and Mücke 1997).

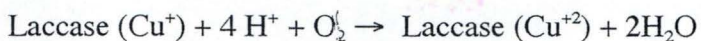
III.3. Participation des atomes de cuivre dans la réaction d'oxydation du substrat

Les laccases font partie de la famille des « oxydases bleues à plusieurs atomes de cuivre » ou Multi Copper Oxydases (MCO) incluant également l'ascorbate oxydase et la ceruloplasmine plasmatique des mammifères. Ces MCO sont caractérisées par la liaison de quatre ou plus de quatre cations cuivre divalent, retrouvés dans différentes conformations au sein de la protéine (types 1 à 4) en des sites appelés centres.

Les laccases, pour leur part, possèdent quatre cations Cu contenus dans les centres T1, T2 et le centre bi-nucléaire T3 de la protéine (figure 5). Le centre T1, fonctionne comme accepteur primaire d'électrons, extrayant les électrons du substrat réduit. Les centres T2 et T3, quant à eux, sont regroupés au sein de la structure de cette oxydase et forment un centre tri-nucléaire où la réduction de l'oxygène moléculaire prend place. Le mécanisme du transfert d'électrons du centre mononucléaire au centre trinuéaire n'est quant à lui pas encore définitivement établi et ne sera donc pas traité (Torres and Wilson 1999) (Ducros, Brzozowski *et al.* 1998).

En résumé :

La laccase réduit l'oxygène par l'intermédiaire des 4 cations Cu^+ . Ceux-ci perdent ensemble 4 électrons. Ils passent de l'étage d'oxydation +1 à l'état d'oxydation +2, suivant la réaction suivante :



Dans cet état oxydé, les Cu^{+2} peuvent oxyder 4 molécules de substrat desquelles ils retirent 4 électrons, ceci permettant aux atomes de cuivre de retourner à leur étage d'oxydation +1, symbolisé par la réaction suivante :

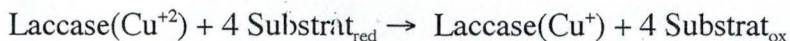




Figure 6 : Structure de CueO, protéine homologue de laccase

La structure de CueO, protéine périplasmique codée par l'opéron régulateur du cuivre *cue* (Cu efflux) chez *Escherichia coli*, expose 3 domaines cupredoxine (différentes couleurs) composés de brins β .

Les centres liant le cuivre peuvent être observés : le centre trinucéaire (T2, T3) comprenant 3 cations Cu (vert clair) liant une molécule d'oxygène (rouge) pour la catalyse, ainsi que le cations Cu isolée du centre T1 (D'après Roberts, Weichsel *et al*, 2002).

III.4. Structure de l'enzyme

La structure de la laccase de *Coprinus cinereus* est l'unique structure de laccase actuellement accessible (Ducros, Brzozowski *et al.* 1998). La structure de cette laccase a été déterminée comme appartenant à :

- la classe des protéines à brins β
- la superfamille des Cupredoxines (avec site de liaison au cuivre) caractérisées par un domaine en sandwich composé de 7 brins β dans deux plans.
- la famille des Cupredoxines Multidomaines, puisque la laccase contient trois de ces domaines (SCOP, 2002)¹.

Dans la famille plus générale des MCO, plusieurs structures sont connues. Au départ de ces structures, un motif d'acides aminés caractéristique du centre tri-nucléaire est composé de quatre répétitions du motif (His-X-His), les histidines intervenant dans la coordination des cations Cu. De cette façon, six histidines coordonnent le centre T3 et deux le centre T2.

Il s'est avéré, dans le cas de la laccase de *Coprinus cinereus*, que la déplétion des atomes de cuivre préalable à la réalisation du cristal a modifié la coordination des atomes du centre T3 induisant la disparition, en densité électronique, du centre T2 (Ducros, Brzozowski *et al.* 1998).

Pour cette raison et par souci de visualisation, la structure d'une MCO homologue, l'oxydoréductase d'efflux du cuivre (CueO), a été choisie pour représenter la structure générale de la laccase (Figure 6).

L'enzyme Cueo est une protéine périplasmique codée dans l'opéron régulateur du cuivre *cue* (Cu efflux) chez *Escherichia coli* (Roberts, Weichsel *et al.* 2002).

III.5. Rôles physiologiques

Les laccases sont largement distribuées au sein du vivant, que ce soit chez les végétaux, les champignons ou, découvertes plus récemment, chez les bactéries, et même dans le venin d'une guêpe (*Pimpla hypochondriaca*) (NCBI version Mai 2002).

Ces enzymes sont impliquées dans un grand nombre de fonctions biologiques. Elles jouent un rôle clef dans la morphogenèse, le développement et le métabolisme de la lignine chez les champignons et les plantes.

Au sein des tissus végétaux, les laccases sont impliquées dans la réponse aux blessures et la synthèse de la lignine.

À l'inverse, chez les champignons, celles-ci sont impliquées dans la ligninolyse.

Les laccases de champignons peuvent jouer un rôle substantiel dans la pathogénie, la sporulation, l'accumulation de pigments et le développement de « fruiting bodies » (Ducros, Brzozowski *et al.* 1998) (Xu, Kulys *et al.* 2000).

¹Structural Classification Of Protein ; <http://scop.berkeley.edu/data/scop.b.c.h.b.e.h.html>

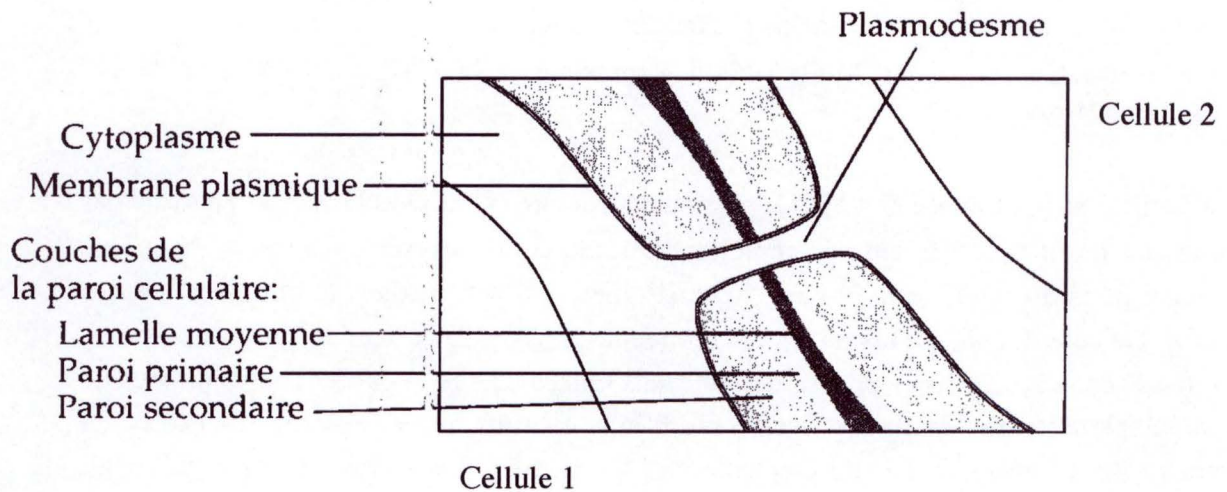


Figure 7 : Schéma de la paroi végétale multicouche.

La lamelle moyenne fusionnée permet la cohésion entre les cellules 1 et 2. Le plasmodesme permet la communication intercellulaire.

La lamelle moyenne est la première à être formée lors de la croissance, suivie de la paroi primaire et secondaire (D'après Campbell 1995).

Ces enzymes, chez les champignons, apparaissent comme extracellulaires et fortement glycosylées (15 à 41% des carbohydrates). Une activité intracellulaire est pas à exclure (Griffith, Martinelli *et al.* 1994).

III.5.1. Lignification versus délignification

Les laccases sont réparties dans la nature et jouent des rôles différents à la fois dans les processus de lignification et de délignification.

III.5.1.1. Paroi végétale

Un grand nombre de polymères de nature polysaccharidique ou phénolique sont retrouvés dans la structure multicouche de la paroi des cellules végétales (figure 7).

Cette paroi est constituée (selon le type cellulaire), au plus, de trois types de couches superposées qui sont, de l'extérieure vers l'intérieure :

- **la lamelle moyenne** formée lors de la division cellulaire.

Elle constituera la partie externe de la membrane et est partagée par les cellules adjacentes.

Sa structure est formée par des composants pectiques (polymères formés à partir de molécules d'acide galacturonique) et protéiques.

- **la paroi primaire** qui est formée après la lamelle moyenne. Elle consiste en un squelette rigide de microfibrilles de cellulose (polymère de glucose) cloisonné dans une matrice formée de composants pectiques, hémicellulosiques (polysaccharides composés d'une variété de sucres tel le xylose, l'arabinose et le mannose qui sont très hydrophiles et forment un gel) et glycoprotéiques. La plasticité de la paroi primaire s'explique par la présence de ponts hydrogènes formés entre les celluloses et hémicelluloses .

- **la paroi secondaire**, dernière couche formée lors de la croissance, est caractérisée par une perte de plasticité. La paroi secondaire est moins hydratée que la paroi primaire et contient moins de composants pectiques et hémicellulosiques. À leur place, d'autres composants sont déposés. Parmi ceux-ci, le composant le mieux connu est sans doute la lignine (polymère phénolique découvert par A. Payen en 1839). Le réseau tridimensionnel formé par ce polymère est composé de liaisons covalentes qui assurent et expliquent la rigidité de la paroi secondaire (Buchanan, Grussem *et al.* 2000).

La lignine est, après la cellulose, le plus abondant produit naturel connu, constituant 20 à 30% des tissus des plantes vasculaires. La lignine est également l'unité de base du xylème (élément conducteur du bois) et des éléments d'affermissement du bois.

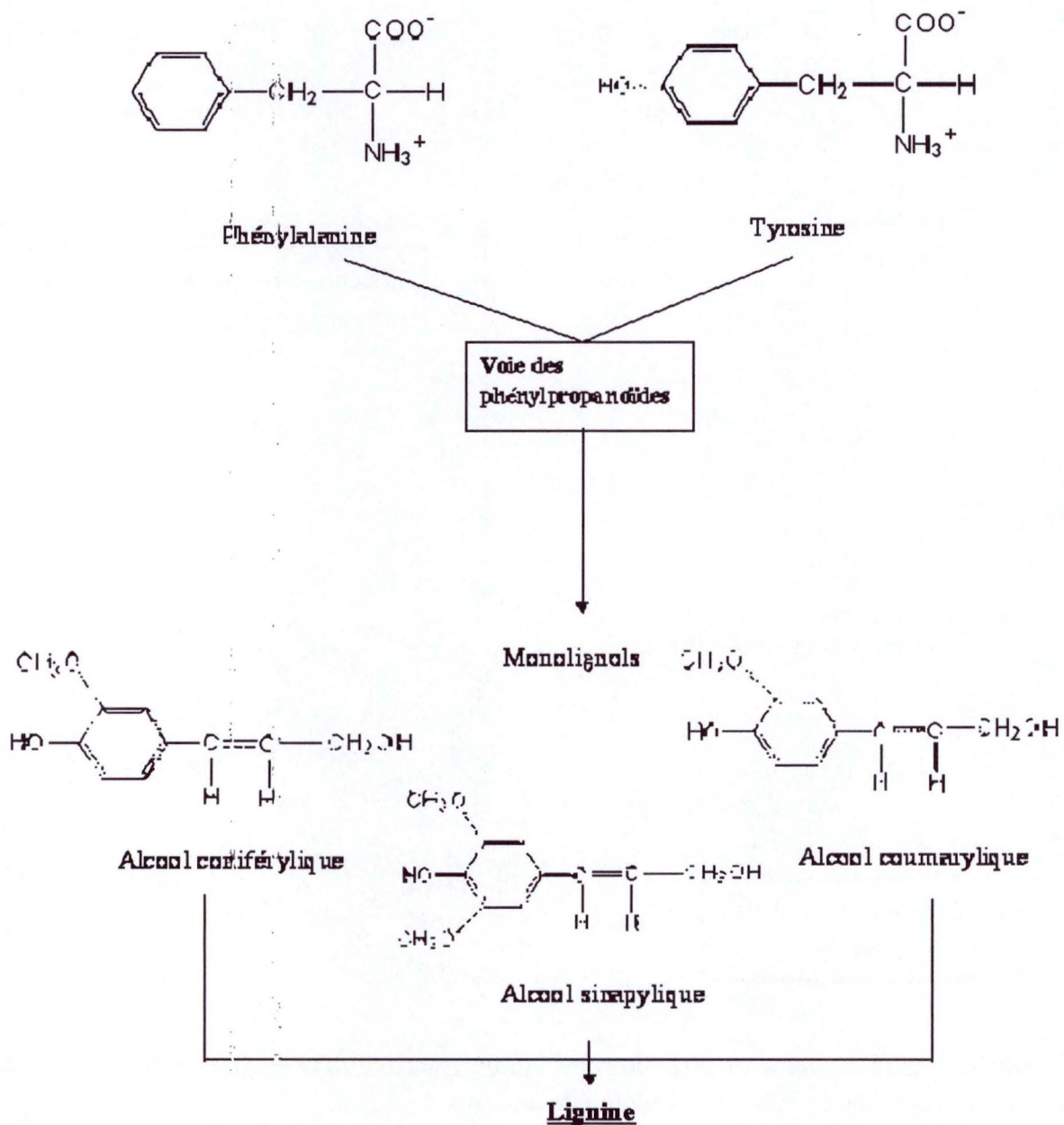


Figure 8 : Précurseurs et produits de la voie des phénylpropanoïdes
(Adapté de Buchanan, Grisse et al. 2000)

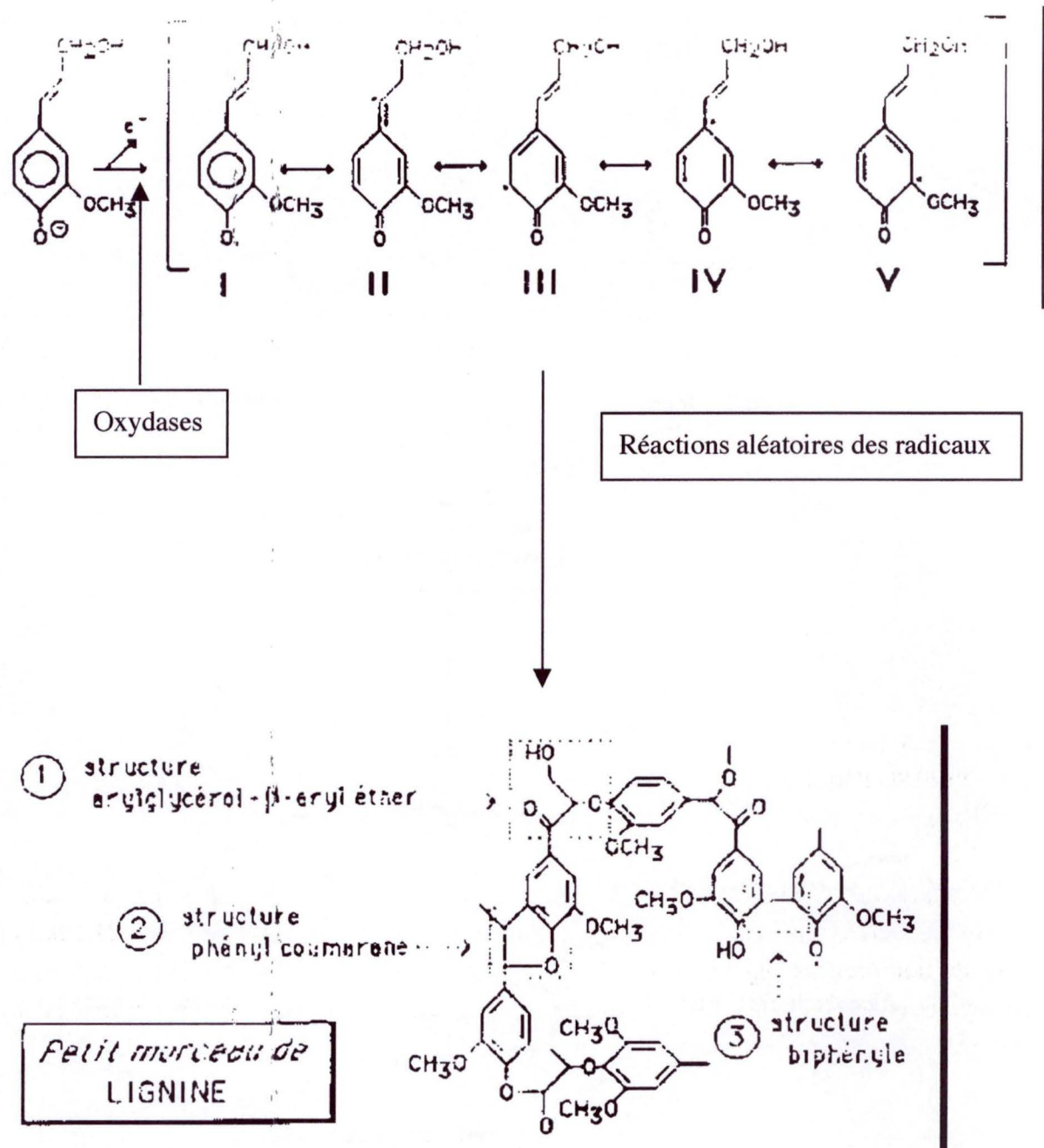


Figure 9 : Lignine, génération de la diversité par polymérisation radicalaire aléatoire

L'action des oxydases induit la formation de radicaux.

Les différentes positions réactives dans les formules mésomères (I à V), marquées d'un point pour les radicaux, expliquent la diversité des liaisons retrouvées dans la lignine. Par exemple, la réaction entre I-II va créer une liaison de type « β O4 » ou arylglycérol- β -aryl éther (n°1 dans la structure de lignine), qui sont les plus nombreuses. La réaction III-III formera une structure biphenyle (n°3), etc. (Adapté de Pelmont 1989).

Il est aussi à remarquer que la lignine a été, sans aucun doute, le prérequis le plus important favorisant la croissance antigravitationnelle des plantes terrestres.

III.5.1.2. Lignification

La lignine est issue de la polymérisation de monolignols.

Les monolignols sont issus de deux acides aminés : la phénylalanine et en moindre mesure la tyrosine. Ces deux acides aminés constituent les précurseurs de la voie des phénylpropanoïdes qui est la voie majeure de synthèse des composés phénoliques chez les végétaux.

La voie des phénylpropanoïdes aboutit, après réduction, hydroxylation et méthylation des précurseurs, à la formation de trois alcools : les monolignols (figure 8).

Ces monolignols sont nommés alcool coumarylique, alcool coniférylique et alcool sinapylique. Ils sont retrouvés en différentes proportions selon les types cellulaires et les espèces végétales.

La lignine est le résultat de la polymérisation spontanée, en majeure partie anarchique, des radicaux nés de ces phénols. En effet, l'observation de la structure radicalaire créée par oxydation de l'alcool coniférylique déprotoné sur sa fonction phénol permet d'observer l'étendue du phénomène de délocalisation du radical (figure 9).

Plusieurs oxydases sont présentées comme pouvant jouer un rôle dans la polymérisation de la lignine avec, parmi celles-ci, la laccase (Buchanan, Grissem *et al.* 2000).

La complexité de la détermination des enzymes d'oxydation intervenant dans la polymérisation oxydative des monolignols est en rapport avec cette même difficulté présente pour de nombreuses oxydases. En effet, ces enzymes présentent différentes isoformes et utilisent une large variété de substrats (plus de 50 gènes de peroxydases sont retrouvés dans le génome d'*Arabidopsis*) (Boudet 1999).

III.5.1.3. Champignons et délignification

Deux types de champignons dégradant le bois sont distingués et sont repris sous le nom quelque peu descriptif de moisissures blanches ou moisissures brunes.

Les moisissures blanches ou « White Rot Fungi » (WRF) sont les plus agressives, elles peuvent attaquer la cellulose et la lignine grâce à leurs enzymes.

Les moisissures brunes ou « Bruin Rot Fungi » (BRF), quant à elles, profitent d'une dégradation préexistante pour s'implanter.

Les champignons sécrètent un grand nombre d'enzymes extracellulaires (ou « sécrétome ») parmi lesquelles certaines sont requises pour la dégradation du bois.

Seules les enzymes impliquées dans ce processus seront exposées, et spécialement les enzymes intervenant dans la dégradation de la lignine.

L'enzymologie de la dégradation du bois la mieux étudiée est celle des moisissures blanches telles que *Phanerochaete chrysosporium* ou *Trametes versicolor* (Call and Mücke 1997).

Bon nombre d'enzymes peuvent jouer un rôle dans le processus complexe de la dégradation naturelle du bois par les champignons. Toutes cependant, n'interviennent pas dans la dégradation de la lignine. Aussi la CDH (cellobiose dehydrogénase), par exemple, est essentielle pour l'invasion du bois, mais n'est pas requise pour la délignification chez *Trametes versicolor* (Dumonceaux, Bartolomew *et al.* 2001).

Les enzymes extracellulaires dégradant réellement la lignine (ligninases ou LME, Lignin Modifying Enzymes) sont composées de trois classes majeures : les laccases, les lignines peroxydases (LiP) et les manganèses peroxydases (MnP). Les LiP et MnP sont toutes deux des protéines à noyau hémique et utilisent le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) pour la catalyse. Certains champignons dégradant le bois sécrètent ces trois classes d'enzymes tandis que d'autres ne sécrètent qu'une ou deux de ces enzymes (Raghukumar, D'souza *et al.* 1999).

La description des réactions impliquées dans la ligninolyse demeure aussi complexe que celle de la polymérisation. En effet, c'est encore uniquement par des molécules modèles que les réactions sont étudiées. Ces dernières sont des composés de faible masse moléculaire contenant une ou plusieurs liaisons typiques de la lignine. Comme la lignine est un polymère des plus variables et des moins bien définis, le recours à des modèles moléculaires s'est avéré utile.

Un modèle commun est un dilignol (figure 10), qui renferme une liaison dite α - β commune dans la structure de la lignine. Les oxydases scindent deux liaisons dont la disparition constitue la principale cause de dépolymérisation de la lignine : le lien α - β dans la chaîne aliphatique et la liaison éther-oxyde. En même temps, apparaissent des réactions de

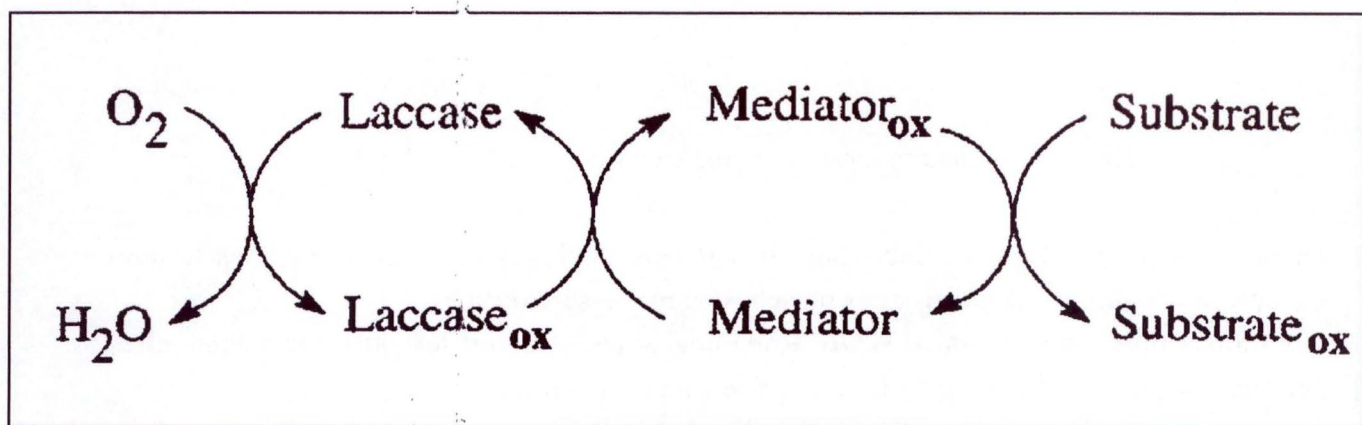


Figure 11 : Rôles des médiateurs dans l'activité enzymatique des laccases

La laccase catalyse le couplage entre la réduction de l'oxygène et l'oxydation d'un médiateur. Celui-ci, retourne à sa forme réduite en oxydant le substrat (D'après Fabrini, 2001)

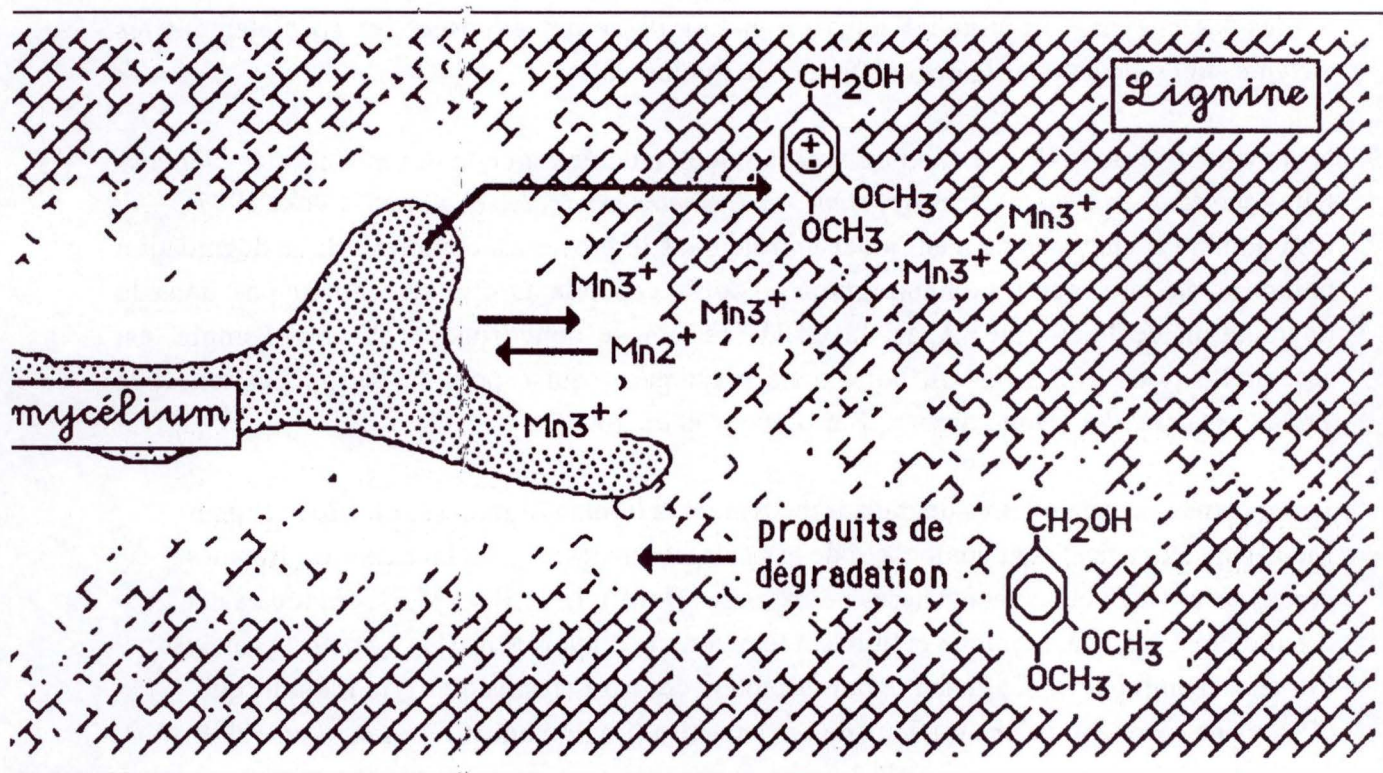


Figure 12 : Envahissement du bois par un mycélium de champignon

Différentes enzymes sont secrétées : cellulases, xylanases, peroxydases et oxydases. L'hydrolyse des polyoses de la paroi fournit des oses (glucose, xylose,...) qui sont attaqués par les oxydases et peroxydases. Celles-ci engendrent un courant de radicaux, d'ions et de petites molécules attaquant la lignine et revenant vers le mycélium avec les produits de dégradation, rechargés à nouveau par les oxydases, et ainsi de suite.

Les champignons sécrètent des médiateurs venant amplifier le phénomène d'oxydation de la lignine. L'alcool vériatrylique, représenté ci-dessus, est l'un de ces médiateurs et peut être utilisé par les LiP et autres oxydases des moisissures blanches (D'après Pelmont, 1989).

déméthylation formant des fonctions phénoliques libres. D'autres réactions sur molécules modèles conduisent à l'attaque du noyau (Pelmont, 1989).

Une différence entre ligninolyse et polymérisation consiste en ce que les enzymes impliquées dans la dégradation du bois usent de « médiateurs » et autres cofacteurs qui peuvent être produits par le champignon ou présents dans le milieu de dégradation ou même dans le bois.

Les médiateurs ou métabolites secondaires sont de petites molécules, voire des atomes, qui ont la capacité d'être oxydés par les enzymes et peuvent, par la suite, oxyder à leur tour d'autres substrats (figure 11) (Fabbrini, Galli *et al.* 2002).

L'alcool vériatrylique est par exemple, un médiateur rédox produit par les moisissures blanches et utilisé comme médiateur par les LiP. Le Mn^{2+} , ion métallique naturellement présent dans le bois, est quant à lui oxydé par les MnP, complexe les acides organiques, et peut oxyder des modèles phénoliques dimériques de lignine (Zouari, Labat *et al.* 2002). Les laccases utilisent également des médiateurs naturels, produits par le champignon (comme l'alcool vériatrylique) ou retrouvés lors de la dégradation de substrats lignocellulosiques (Johannes and Majcherczyk, 2000).

La ligninolyse peut être comparée à un véritable bombardement de radicaux et d'ions produits par un grand nombre d'enzymes au départ de produits retrouvés au sein des réactions en cascades complexes de la ligninolyse. Un schéma très simpliste décrivant de façon générale le processus qu'utilise le mycélium est présenté (figure 12).

Différentes enzymes sont sécrétées : cellulases, xylanases, peroxydases et oxydases.

L'hydrolyse des polyoses de la paroi fournit des oses (glucose, xylose,...) qui sont attaqués par les oxydases et peroxydases. Celles-ci engendrent un courant de radicaux, d'ions et de petites molécules attaquant la lignine et revenant vers le mycélium avec les produits de dégradation, rechargés à nouveau par les oxydases, et ainsi de suite (Pelmont 1989).

IV. Applications

La lignine constitue un véritable obstacle pour l'industrie de la pâte à papier.

Certains processus de blanchiment de la pâte à papier se réalisent à des températures et pH extrêmes. Des enzymes purifiées seraient préférées aux processus chimiques de délignification très polluants et coûteux, pour autant qu'elles puissent résister aux conditions extrêmes retrouvées dans ces processus industriels.

L'activité des laccases vis-à-vis de la lignine a largement été étudiée à travers le développement de systèmes utilisés pour la dégradation de la pâte à papier.

Il s'est rapidement avéré que les laccases seules n'avaient que peu d'effet sur la pulpe de bois prouvant que l'enzyme n'est qu'un des composants d'un système biologique complexe.

La protéine ne peut, en réalité, diffuser à travers les fibres de la pulpe de bois de par sa taille. Pour contourner cette limitation, les chercheurs se sont focalisés sur l'utilisation des médiateurs. Ces médiateurs sont oxydés par l'enzyme. Une fois oxydés les médiateurs peuvent retourner à leurs formes réduites en oxydant la pulpe de bois. Une centaine de médiateurs potentiels ont été décrits, parmi lesquels le 1-hydroxybenzotriazole (HBT) (figure 13) et le 2,2'-azino-bis-(acide 3-éthylbenzothiazolin-6-sulfonique) (ABTS) sont les plus souvent utilisés. Ces deux médiateurs sont oxydés par la laccase, l'HBT en radical (HBT°) et l'ABTS en radical cationique (ABTS +.) et en di-cation (ABTS 2+) réagissant et déstructurant la trame de la lignine.

Le grand désavantage de ces systèmes est leur prix de synthèse et leur forte toxicité. Actuellement, les chercheurs s'orientent vers la découverte de médiateurs naturels exploitables. Plusieurs médiateurs naturels ont d'ores et déjà été identifiés comme des produits de *Trametes versicolor* ou retrouvés dans le substrat de dégradation de la lignocellulose, médiant l'oxydation d'aromatiques polycycliques carbonés (Johannes and Majcherczyk 2000).

Outre l'application de ces enzymes pour la délignification de la pulpe de bois, les laccases sont d'application courante dans les processus de décoloration des déchets textiles, la détoxification d'effluents, la composition des poudres à lessiver, le retrait des phénols du vin et la transformation d'antibiotiques et de stéroïdes.

Les propriétés catalytiques des laccases ont également un grand impact sur le développement de bio-senseurs que ce soit pour la détection de polluants ou celle de métabolites.

OBJECTIFS ET STRATEGIE DU TRAVAIL

L'objectif de ce travail est de cloner un gène de laccase chez *Scytalidium acidophilum*.

Dans ce but, une banque d'ADN génomique du champignon *S. acidophilum* réalisée, au préalable, au laboratoire (I.Housen) sera utilisée.

La première étape du travail nécessite la détermination d'une sonde homologue au(x) gène(s) de laccase de *S. acidophilum* afin de cribler la banque.

À cette fin, des alignements multiples basés sur les séquences protéiques connues de laccases, seront réalisés afin de déterminer des amorces spécifiques de gènes de laccase.

Les amorces dégénérées déterminées seront utilisées pour amplifier par PCR un (des) fragment(s) du (des) gène(s) à partir de l'ADN génomique du champignon.

Les fragments amplifiés (ou amplicons) obtenus seront clonés, identifiés comme fragments authentiques de gène de laccase et utilisés comme sonde autologue pour cribler la banque.

La seconde étape du travail consistera à cribler la banque au moyen de la sonde marquée et de caractériser les clones positifs.

Ce travail accompli, la protéine sera surexprimée en levure. L'enzyme purifiée pourra être étudiée au plan fondamental afin d'analyser les bases structurelles de ses caractéristiques particulières ou être testée et modifiée par « protein design » en vue d'applications technologiques.

RESULTATS

I. Obtention d'une sonde

I.1. Alignements de séquences de laccase

Une recherche dans la banque de données protéiques non-redondante (Matériel et Méthodes, point III.1) du NCBI (version du 10/9/2001) a été effectuée et nous a permis d'obtenir 294 séquences de laccase.

L'ensemble de ces séquences appartiennent aux plantes supérieures et aux champignons et, pour une seule d'entre elles, au monde bactérien.

Aucune séquence appartenant au genre *Scytalidium* n'y figure.

Au départ de ces séquences, deux alignements multiples ont été réalisés : un premier alignement regroupant l'ensemble des 294 séquences obtenues lors de la recherche, et un deuxième restreint aux séquences de champignons.

I.1.1. Alignement général

L'alignement réalisé sur l'entièreté des 294 séquences ne permet pas de déterminer des régions conservées. Ce résultat est dû à la trop grande hétérogénéité des séquences utilisées.

Deux étapes préalables de tri ont été entreprises.

Dans la première étape, l'entièreté des séquences est visualisée en fonction de leur taille. Les séquences de taille largement inférieures (<100 aa) à la moyenne (variant entre 400 et 700 aa) sont éliminées.

Dans un second temps, les 227 séquences restantes ont été soumises au programme PURGE (Neuwald, Liu *et al.* 1995) (Matériel et Méthodes, point III.2.2). Ce programme permet de supprimer les séquences présentant une forte similarité entre elles. Il élimine toutes les séquences présentant un seuil de similarité (ou score BLAST (Altschul, Gish *et al.* 1990)) fixé, ici, à 500 (Matériel et Méthodes, point III.2.1). Le but est de supprimer les séquences similaires répétées qui peuvent induire des biais lors d'alignements subséquents.

À la suite de ce tri préalable, 37 séquences ont été sélectionnées. Des alignements multiples ont été réalisés sur ces séquences. Un premier alignement a été réalisé au moyen du logiciel CLUSTAL W (Thompson, Higgins *et al.* 1994) (Matériel et Méthodes, point III.3.1). Ce logiciel réalise des comparaisons paires entre chacune des séquences dans leur entièreté.

L'alignement obtenu permet d'observer les séquences qui présentent des « gaps » trop importants en raison de leur forte divergence par rapport aux autres séquences. Ces séquences trop divergentes seront dès lors retirées. Les 21 séquences restantes seront alors soumises au logiciel MATCH-BOX (Depiereux, Baudoux *et al.* 1997) (Matériel et Méthodes, point III.3.2).

¹National Center for Biotechnology Information ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Données confidentielles

Figure 1. Représentation des boîtes les mieux conservées de l'alignement général des laccases (annexe 1)

Les six boîtes les plus conservées ont été reprises de l'alignement MATCH-BOX et sont détaillées ci-dessus. Pour chaque boîte, la position au sein de l'alignement est indiquée par le numéro de l'un des acides aminés de celle-ci. Les chiffres de la marge de gauche réfèrent aux organismes desquels les séquences sont issues. Les différents indices de confiance (de 1 à 9) attribués se retrouvent au bas des séquences..

Données confidentielles

Figure 2. Représentation des boîtes les mieux conservées de l'alignement global des laccases de champignon (annexe 2)

Pour chaque boîte, la position au sein de l'alignement est indiquée par le numéro de l'un des acides aminés de celle-ci. Les chiffres de la marge de gauche réfèrent aux organismes desquels les séquences sont issues. Les différents indices de confiance (de 1 à 5) attribués se retrouvent au bas des séquences.

Le logiciel MATCH-BOX est utilisé dans la dernière phase du traitement des séquences car il permet de déterminer des régions conservées (ou boîtes) parmi l'ensemble des séquences sur base de caractéristiques physico-chimiques des acides aminés. Pour chaque boîte conservée, le logiciel donne un indice de confiance ou score. Pour ce logiciel, au plus les scores (variant de 1 à 9) sont faibles, au plus la certitude de conservation d'un motif est importante.

Au sein de l'alignement MATCH-BOX, 14 régions conservées ont été mises en évidence (annexe 1), parmi lesquelles les 4 boîtes sont très conservées (figure 1). Néanmoins, les scores obtenus (de 4 à 7) ne nous permettent pas de nous baser sur cet alignement. En effet, lors de ce travail, le score minimal retenu pour déterminer un motif comme suffisamment conservé est de cinq, score correspondant à une probabilité de 5/10 d'obtenir un faux positif (si un score de 7 est attribué, il y a une probabilité de 7/10 d'utiliser un faux positif).

Afin d'obtenir un alignement contenant des motifs de séquences plus significativement identifiés comme conservés, l'origine des séquences de laccase a été restreinte aux organismes les plus proches de *Scytalidium acidophilum*.

I.1.2. Alignement des laccases de champignons

Parmi les 297 séquences de départ, 120 séquences de champignons ont été sélectionnées.

Ces 120 séquences appartiennent à 2 divisions de champignons : les Ascomycètes et les Basidiomycètes.

Les mêmes étapes de traitement des données qu'au point I.1.1 ont été réalisées.

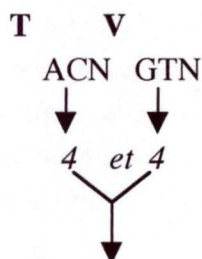
La première est un PURGE (score BLAST ou seuil de 1000) par lequel 35 séquences ont été sélectionnées. Ensuite, l'alignement CLUSTAL W a permis de retirer 8 séquences ne s'accordant pas avec les boîtes conservées. Enfin, les 27 séquences restantes sont alignées par MATCH-BOX (annexe 2).

Au sein de cet alignement, 10 boîtes sont déterminées avec des indices de confiance allant de 1 à 8 (figure 2). Ces régions conservées sont spécifiques des laccases et ne se retrouvent pas dans d'autres oxydases Cu dépendantes. En effet, la comparaison à l'aide du logiciel BLAST P des séquences en acides aminés retrouvées dans ces boîtes avec celles de la banque non-redondante de protéines ne met en évidence que des séquences de laccases.

Au départ de l'alignement de la figure 2, deux zones conservées xxxxxxxx seront choisies afin de définir des amorces oligonucléotidiques dégénérées.

Ces amorces seront utilisées pour tenter d'amplifier par PCR, au départ de l'ADN génomique de *S. acidophilum*, un fragment d'ADN d'un gène de laccase (« autologue »).

- les acides aminés :
- leurs codons :
- la dégénérescence :



Soit 16 combinaisons nucléotidiques différentes pour les a.a. "TU".

Figure 3 . Illustration du calcul de la dégénérescence nucléotidique correspondant à 2 aa.

4 codons code pour la Thréonine (T) : ACA, ACC, ACG et ACT ou ACN (N représente les 4 nucléotides)

4 codons code pour la Valine (V): GTA, GTC, GTG et GTT ou GTN (N représente les 4 nucléotides).

Il y a donc 4×4 , 16 possibilités de séquences de 6 nucléotides codant pour le doublet Thréonine-Valine.

Données confidentielles

Figure 4. Représentation schématique du gène de laccase

Les quatre boîtes les plus conservées (carrés noirs) contenant chacune un motif de liaison au cuivre sont positionnées sur le gène d'après l'alignement. Les distances en acides aminés entre chaque boîte sont indiquées.

I.2. Détermination de couples d'amorces

I.2.1. Choix de boîtes conservées

Plusieurs combinaisons sont, à ce stade, possibles sur base des boîtes les plus conservées déterminées au point I.1.2 (figure 4). Pour le choix de la ou des combinaisons de boîtes, trois critères principaux sont pris en compte :

1. La taille attendue de l'amplicon

La taille potentielle de l'amplicon, attendue avec la paire d'amorces choisie, doit être compatible avec un bon rendement PCR.

2. Le niveau de dégénérescence des amorces oligonucléotidiques

Pour définir une amorce codant pour une séquence d'acides aminés, la dégénérescence du code est prise en compte. L'amorce dégénérée consiste en un ensemble de séquences nucléotidiques différentes codant pour une même séquence d'acides aminés. Il faut veiller à ce que le nombre de séquences nucléotidiques différentes ne soit pas trop important et ne dépasse pas le seuil généralement accepté de 256 voire 512. En effet, au plus ce nombre sera élevé, au moins la concentration de la séquence de sonde strictement homologue parmi l'ensemble des séquences possibles sera importante et donc au moins l'hybridation correcte de ce primer homologue aura de chance d'avoir lieu. Afin d'illustrer le principe de dégénérescence et son calcul, un exemple est repris à la figure 3.

On veille généralement, en outre, à choisir une amorce où la dégénérescence du côté 3' soit faible et avec un contenu en G et C élevé, ceci afin d'augmenter les chances d'appariement des amorces.

3. La taille des amorces

Une taille de **x** nucléotides est un compromis pour atteindre une stabilité d'interactions suffisante sans augmenter exagérément le taux de dégénérescence.

Résultats :

a) Le choix de l'amorce 5' et 3' dans 2 boîtes conservées trop éloignées a été écarté.

Par exemple, l'utilisation de la combinaison d'amorces, l'une définie dans la boîte **x**, l'autre dans la boîte **y** donnerait un amplicon **trop grand** (figure 4), sans tenir compte de la présence éventuelle d'introns. Seules deux combinaisons ont donc été analysées (**xxx** et **yyy**).

- a) Boîte y b) Liste des séquences différentes en acides aminés retrouvées c) « Rétro-traduction » et dégénérescence

Données confidentielles

Figure 5. Exemple du processus de sélection suivi pour la détermination des amorces

Données confidentielles

Figure 6. Définition d'une même amorce pour deux séquences protéiques différentes (par exemple, séquence 5 et 3 de la boîte a).

b) Le choix d'amorces, l'une dans la boîte **y** et l'autre dans la boîte **z** a été écartée.

En effet, parmi les 8 séquences protéiques conservées de la boîte **y** (figure 5) la séquence « **XXXXXXXX** », dont les 6 premiers aa (**XXXXXX**) ou les 6 derniers aa (**XXXXXX**) sont sélectionnés, nécessite la définition d'une amorce dont la dégénérescence est de 1152, soit trop élevée.

De plus, la dégénérescence du côté 3' de l'amorce est trop importante, ceci pour six des huit séquences protéiques différentes que contient la boîte **y**.

c) Le choix des boîtes conservées pour y définir les amorces 5' et 3' c'est donc porté respectivement sur les boîtes **a** et **b**.

I.2.2. Détermination des amorces et couples d'amorces 5' et 3' sur base des boîtes **a** et **b**

a) Les séquences protéiques des boîtes **a** et **b** ont été analysées :

-Pour la boîte **a**, **x** séquences protéiques différentes ont été retrouvées (figure 6A). Afin de déterminer le nombre minimal d'amorces nucléotidiques codant pour ces 6 séquences protéiques, certaines d'entre elles (par exemple les séquences 3 et 5 figure 6B) sont définies par une même amorces (figure 6C). Neuf amorces dégénérées (Lac 5'.1 à Lac 5'.9) ont ainsi été déterminées (tableau 1A).

-Pour la boîte **b**, sept séquences protéiques différentes ont été retrouvées (figure 6A), à partir desquelles douze amorces (Lac 3'.1 à Lac 3'.12) ont été déterminées (tableau 1B).

Il est à remarquer que la présence de liaisons fortes a été privilégiée aux extrémités 3' des amorces.

b) Au départ des 9 amorces 5' (Lac 5'.1 à Lac 5'.9) et des 12 amorces 3' (Lac 3'.1 à Lac 3'.12), 118 combinaisons théoriques d'amorces (Lac5'x-Lac3'y) pourraient être testées en PCR. Pour diminuer le nombre de PCR, notre choix s'est porté sur les couples d'amorces 5'-3' correspondant à des couples de séquences en acides aminés retrouvées dans une même séquence de laccase.

Par exemple, les acides aminés **XXXXXX** de la boîte **a** se retrouvent soit avec les acides aminés **YYYYYY**, soit avec **YYYYYY**, soit avec **YYYYYY**, soit avec **YYYYYY**, soit avec **YYYYYY** ou encore avec **YYYYYY** de la boîte **b** (figure 2).

En conséquence, l'amorce nucléotidique Lac5'.2 codant pour la séquence **XXXXXX** (Tableau 1, boîte **a**) sera utilisée en PCR uniquement soit avec l'amorce nucléotidique Lac3'3 à 6 codant pour la séquence **YYYYYY**, soit avec l'amorce nucléotidique Lac3'7 codant pour la séquence **YYYYYY**, soit avec l'amorce nucléotidique Lac3'8 codant pour la séquence **YYYYYY**, soit avec l'amorce nucléotidique Lac3'9 ou 10 codant pour la séquence **YYYYYY**, soit avec l'amorce nucléotidique Lac3'11 codant pour la séquence **YYYYYY** ou encore avec l'amorce nucléotidique Lac3'12 codant pour la séquence **YYYYYY**. L'amorce Lac5'2 ne sera pas utilisée en combinaison avec les amorces Lac3'1 et Lac3'2.

Tableau 1 : Détermination des amorces pour les boîtes a et b.

A) Boîte a Amorces 5'.

	Séquences protéiques et Amorces correspondantes.	Dégénérescence.
	Données confidentielles	
1		
lac5'.1		128
2		
Lac5'2		192
lac5'.3		96
3		
lac5'.4		64
lac5'.5		32
lac5'.6		32
lac5'.7		16
4		
lac5'.8		128
lac5'.9		32

Première colonne : Numéro des séquences protéiques et nom des amorces 5' : Lac5'1 à Lac 5' 9.

Deuxième colonne : Séquence en acide aminés (en gras) et séquence(s) nucléotidique(s) correspondante(s).

Troisième colonne indique la dégénérescence de chaque amorce.

B) Boîte 2 . Amorces 3'.

	Séquences protéiques et Amorces correspondantes.	Dégénérescence.
	Données confidentielles	
1		
lac3'.1		256
lac3'.2		128
2		
lac3'.3		256
lac3'.4		128
lac3'.5		128
lac3'.6		64
3		
lac3'.7		128
4		
lac3'.8		64
5		
lac3'.9		256
lac3'.10		128
6		
lac3'.11		256
7		
lac3'.12		128

Première colonne : Nom des amorces 5' : Lac3'1 à Lac 3' 12.

Deuxième colonne : Séquence en acide aminés (en gras) et séquence(s) nucléotidique(s) correspondante(s).

Troisième colonne :Indique la dégénérescence de chaque amorce.

Tableau 2: Combinaisons d'amorces en vue des PCR, déterminées sur base des combinaisons de séquences protéiques des boîtes a et b (cfr.texte).

n° PCR	Amorce 5': n° et sequence.	Amorce 3': n° et séquence
1	Données confidentielles	Données confidentielles
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		
11		
12		
13		
14		
15		
16		
17		
18		
19		
20		
21		
22		
23		
24		
25		
26		
27		
28		
29		

N°PCR.	Combinaisons des amorces.		Taille (pb) des amplicons.	Température d'hybridation.	Concentration estimée (ng).	Reproductibilité.
	5 '	3 '				
12	lac5'.2	lac3'.12	x y	42-40 40	< 100 < 100	confirmé confirmé
13	lac5'.3	lac3'.3	y	40	< 100	
14	lac5'.3	lac3'.4	w	45	< 100	
15	lac5'.3	lac3'.5	w	49-45	700	
16	lac5'.3	lac3'.6	z w	45-42-40 49-45-42	200, 200, 200 1000, 300, 200	confirmé
17	lac5'.3	lac3'.7	x (*) y (*) w	45-42 45-42 49-45-42	400, 400 200, 200 300, 300, 300	
20	lac5'.3	lac3'.9	w	49	800	confirmé
22	lac5'.3	lac3'.12	x	42	< 100	
23	lac5'.4	lac3'.12	x w	42 45	< 100 < 100	confirmé
24	lac5'.5	lac3'.12	x (*) w	45 42	200 300	

Tableau 3 : Résultats des PCR à gradient de température
 Quatre tailles d’amplification sont retrouvées. Ces amplicons ont les tailles suivantes : 140, 400, 850 et 1600 pb. Par paires d’amorces, 1, 2 ou 3 amplicons sont présents.
 (*) = amplicon apparu lors des PCR visant à tester la reproductibilité de la méthode (cfr.texte)

Données confidentielles

Figure 7 : Résultats illustratifs des PCR à gradient de température
 Nous présentons les PCR n° 12, n°16, n°17 et n°20. Les tailles observées des amplicons ainsi que les conditions de réaction pour chaque PCR sont détaillées dans le tableau 3. Le marqueur de taille utilisé

De cette manière 29 des 118 combinaisons d'amorces possibles ont été retenues (tableau 2) et seront par la suite testées en PCR.

I.3. PCR à gradient de température

Les réactions PCR pour isoler un fragment d'un gène de laccase de l'ADN génomique ont été réalisées avec les amorces dégénérées 5' et 3' définies au point I.2.2.

L'utilisation d'amorces dégénérées implique que, par amorce, il y a un grand nombre de séquences différentes avec, pour chacune, une température d'hybridation spécifique.

L'utilisation d'un appareil PCR réalisant un gradient discontinu de température a permis de tester 6 températures d'hybridation différentes par paire d'amorces afin de déterminer la température adéquate à l'amplification d'un fragment d'ADN.

Le gradient comprend six températures comprises entre 40 et 60°C et les PCR ont été réalisées sur l'ADN génomique de *S. acidophilum* préparé comme décrit au point IV.1 du Matériel et Méthodes.

Les 29 combinaisons d'amorces définies précédemment ont été testées aux six températures du gradient, soit 198 réactions PCR (Matériel et Méthodes, point IV.2).

Ces 174 PCR ont été réalisées dans les mêmes conditions et avec un contrôle négatif (sans ADN pour les six températures).

La taille attendue de l'amplicon supposé sans intron est, sur base de l'alignement, de **x pb**.

Les produits PCR ont été analysés sur gel d'agarose (Matériel et Méthodes, point IV.3). Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 3 et illustrés par quelques produits PCR (figure 7).

Seules 10 des 29 combinaisons d'amorces réalisées ont abouti à la formation de produits d'amplification. Ces amplicons ont les tailles suivantes : **x, y, z et w pb**.

Par paires d'amorces, 1, 2 ou 3 amplicons sont présents.

Afin de tester la reproductibilité de la méthode, les PCR avec les combinaisons d'amorces ayant abouti à un produit d'amplification ont été reproduites.

La méthode s'avère peu reproductible puisque seuls 5 amplicons sur 16 ont été confirmés et de nouveaux amplicons sont apparus. Néanmoins, plusieurs amplicons ont pu être obtenus dont un possédant une taille (**x pb**) correspondant à la taille attendue pour le fragment de laccase supposé sans intron (figure 7).

Amplicon de x pb.

Amplicon de y pb.

Amplicon de w pb.

pAG 1

pAG 2 et 3

pAG 4 et 5

Données confidentielles

Figure 8. Analyse de restriction des plasmides pAG 1, 2, 3, 4, 5

I.4. Clonage des amplicons

I.4.1. Clonage des fragments de x, y, z et w pb

Le clonage a été réalisé à partir des amplicons issus des PCR.

Nous avons choisi, parmi les amplicons à cloner, ceux qui avaient des tailles différentes (et dans chaque catégorie celui qui avait donné lieu à la meilleure amplification) ainsi que ceux qui, bien que de même taille, ont été obtenus avec des couples d'amorces distincts.

Les amplicons ont été clonés dans le pGEM-T easy (Matériel et Méthodes, point II.2.2).

Les produits PCR sont purifiés sur gel d'agarose et « ligués » dans le pGEM-T easy. Le mélange de ligation a servi à la transformation de la souche DH10B d'*E. coli*. Le mélange de transformation a été étalé sur milieu solide additionné d'ampicilline, de Xgal et d'IPTG. Pour chaque transformation, des colonies blanches ont servi à ensemencer 5 ml de LB liquide additionné d'ampicilline. Au départ de ces petites cultures, l'ADN plasmidique a été préparé (Matériel et Méthodes, point IV.9).

Des clones contenant un plasmide recombinant avec un insert de x, y et w pb ont été obtenus (figure 8).

-Pour les amplicons de x pb, un seul produit PCR (PCR n°12) a pu être cloné sur les 2 amplicons tentés (PCR n°12 et 23), soit le plasmide pAG 1.

-Pour les amplicons de y pb, deux produits PCR ont pu être clonés (PCR n°12 et 17), soit les plasmides pAG 2 et 3.

-Pour les amplicons de w pb, deux produits PCR ont pu être clonés (PCR n°16 et 17), soit les plasmides pAG 4 et 5.

-Pour l'insert de z pb, aucun clone recombinant n'a pu être trouvé, ce qui pourrait résulter d'une toxicité de l'insert pour les cellules d'*E. coli*.

I.4.2. Analyse des séquences des amplicons de x, y et w pb

L'ADN des plasmides pAG 1, 2, 3, 4, 5 contenant respectivement les inserts de x, y et w pb a été soumis à une réaction de séquençage (Matériel et Méthodes, point IV.10).

Ces séquences ont été analysées avec les résultats suivants.

I.4.2.1

Les séquences des amplicons de y pb clonés dans le plasmide pAG 2 et 3 sont différentes.

L'amorce 5' est retrouvée en amont et en aval de cet amplicon dans les deux cas. Les séquences des amplicons ont, par la suite, été soumises au logiciel BLAST X qui traduit les

Figure 9. Caractérisation de l'amplicon de x pb
Analyse de séquence (A) et recherche d'homologie (B).

Données confidentielles

A. Séquence nucléotidique et protéique déduites de l'amplicon de 140 pb

Données confidentielles

b) Identification d'un homologue (72%) et identitique (62%) à l'amplicon de x pb

séquences dans leurs six phases de lecture et les comparent directement à la banque de données protéiques non-redondante.

Aucun des deux amplicons de y pb issus des PCR 12 et 17 ne présentent d'homologie avec une protéine connue.

I.4.2.2

Les séquences des amplicons de w pb clonés dans les plasmides pAG 4 et 5 sont identiques. Comme pour le point I.4.2.1, seule l'amorce 5' a été retrouvée de part et d'autre de l'insert. Une recherche d'homologue de séquence avec le logiciel BLAST X ne permet pas d'identifier de protéine connue.

I.4.2.3

Pour l'amplicon de x pb cloné dans le pAG 1, les amorces 5' et 3' sont retrouvées de part et d'autre de l'insert. Un peptide de 48 a.a. a été déduit de cette séquence. La comparaison de cette séquence protéique par le logiciel BLAST P à la banque de séquences protéiques non-redondante met en évidence une homologie de 72% et une identité de 62% avec la laccase de XXX (figure 9 A et B).

La présence d'intron est cependant permise. En effet, chez un certain nombre de champignons dont *Aspergillus*, *Botryotinia* et *Polyporus*, un intron est présent entre les deux premiers sites de liaison au cuivre (boîtes a et b, dont les séquences nucléotidiques (NCBI) ont été analysées), à partir desquels les amorces ont été déterminées. Par contre, pour une espèce proche de *S. acidophilum*, *Scytalidium thermophilum*, aucun intron n'apparaît entre ces deux sites (Brevet :US 5750388)¹,

I.4.3. En conclusion

Nous disposons donc d'un fragment d'ADN génomique amplifié par PCR présentant une taille de x pb. Cette taille correspond à la taille théorique entre les boîtes conservées a et b à partir desquelles les amorces ont été définies.

En outre, la traduction de cette séquence permet l'obtention d'un peptide présentant 72% d'homologie et 62% d'identité avec la laccase de XXX.

Ce fragment témoigne de l'existence d'un gène de laccase chez *S. acidophilum* et sera donc utilisé comme sonde autologue pour cribler la banque d'ADN génomique de *S. acidophilum*.

¹ European patent office ; <http://ep.espacenet.com/ep/en/level1.htm>

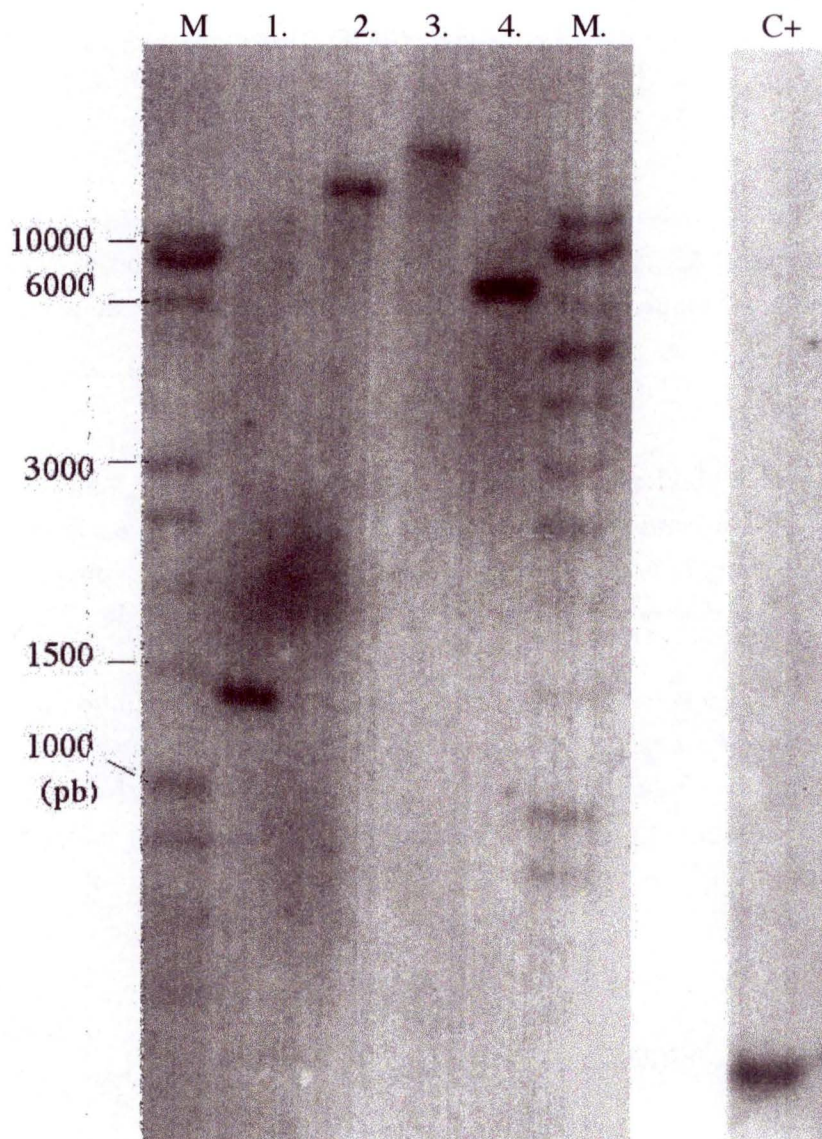


Figure 10. Southern-blot réalisé sur l'ADN génomique de *S. acidophilum*.

ADN génomique restreint par :

Piste 1 = *EcoRI*

Piste 2 = *HindIII*

Piste 3 = *XbaI*

Piste 4 = *XhoI*

C+ = contrôle positif (plasmide pAG 1 restreint par *EcoRI* contenant l'insert de 140 pb)

M = Marqueur de taille (Hyperladder).

II. Utilisation de la sonde de laccase chez *S. acidophilum*

II.1. Southern blot

Afin de confirmer l'existence d'un gène de laccase chez *S. acidophilum*, un Southern-blot a été réalisé avec, pour sonde, l'amplicon de x pb marqué.

II.1.1. Sonde

Sur base de la séquence obtenue à partir du plasmide pAG 1, des oligonucléotides spécifiques « LacS 5' » et « LacS 3' » ont été définis. Ces oligonucléotides codent respectivement pour les séquences protéiques « XXXXXX » de la boîte a et « YYYYYY » de la boîte b

Ces amorces spécifiques ont permis d'amplifier le fragment de x pb du gène de laccase au départ du pAG 1. La séquence des oligonucléotides ainsi que les conditions d'amplification PCR sont décrites au point IV.2. du Matériel et Méthodes. Le fragment de x pb a été purifié par électrophorèse préparative et a servi de matrice dans une réaction de marquage au $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ -dCTP par amorces aléatoires (Matériel et Méthodes, point IV.11.5). La sonde « Lac » a été obtenue.

II.1.2. Hybridation en Southern-blot de la sonde sur l'ADN génomique de *S. acidophilum*

De l'ADN génomique de *S. acidophilum* a été préparé et digéré par différentes enzymes de restriction ne coupant pas la séquence de la sonde. Un contrôle positif a été réalisé en utilisant le plasmide pAG 1 restreint par *EcoRI*. Un Southern-blot a été réalisé (Matériel et Méthodes, point IV.11).

L'autoradiographie présentée à la figure 10 révèle que la sonde s'hybride fortement à l'ADN de *S. acidophilum* au niveau d'une bande unique, permettant de confirmer la validité de la sonde ainsi que la présence d'un gène de laccase dans le génome de *S. acidophilum*.

II.2. Description et validité de la banque

La banque génomique utilisée a été établie au laboratoire (I.Housen). Cette banque est constituée d'inserts de 3 à 6 kb obtenus par restriction partielle *Sau3A* de l'ADN génomique de *S. acidophilum*. Ces fragments ont été clonés au site *BamHI* du vecteur pUC 19 (Matériel et Méthodes, point II.1.2) et transformés dans la souche DH10b d'*E. coli*.

La qualité de la banque a été vérifiée par restriction *EcoRI-HindIII* sur les plasmides issus de 24 transformants. Le taux de recombinants est de 60% et la diversité testée sur 24 clones est de 100 % (résultats non montrés).

II.3. Criblage de la banque d'ADN génomique

L'objectif est d'isoler des candidats positifs de la banque par un criblage de celle-ci au moyen de la sonde nucléotidique marquée autologue (Lac). Ce criblage est réalisé en plusieurs étapes. Les colonies identifiées comme positives après un premier étalement sont ré-étalées et re-sondées. Eventuellement, une troisième étape similaire de purification clonale pourra être réalisée.

II.3.1. Première tentative de clonage

II.3.1.1. Criblage proprement dit

Les clones de la banque ont été étalés sur milieu solide LB ampicilline à une densité d'environ 10^4 clones par boîte de Pétri (14 cm de diamètre). Les colonies de dix boîtes ont été répliquées sur filtre de nylon, lysées et hybridées avec la sonde Lac. Les membranes ont ensuite été lavées, soumises à une autoradiographie et révélées (Matériel et Méthodes, point IV.13).

Deux signaux ou « spots » ressortant du bruit de fond ont été identifiés. Pour chacun de ces deux spots (figure 11), 5 clones ont été identifiés et soumis à un deuxième crible de validation. À cette fin, les clones ont été prélevés individuellement (colonies 4.1 à 4.5 (boîte 4) et 8.1 à 8.5 (boîte 8)) et mis en suspension dans 200 μ l de LB liquide 15 % glycérol. En suite, 100 μ l sont stockés à -80°C , les 100 μ l restants sont soumis à des dilutions 10^{-4} et 10^{-5} et étalés sur milieu solide additionné d'ampicilline. Au total, 20 boîtes sont ainsi obtenues. Parmi ces 20 boîtes (10 boîtes de dilution 10^{-4} et 10 autres boîtes de dilution 10^{-5}), 1 boîte pour chaque clone a été retenue en vertu de la densité adéquate de colonies, soit 10 boîtes au total. Pour chaque boîte, les mêmes étapes que celles réalisées lors du premier étalement ont été effectuées.

Un grand nombre de spots a été mis en évidence (figure 12).

Une observation intrigante est que la grande majorité des boîtes présente des spots, alors que normalement, une seule des cinq colonies prélevées devait être à l'origine du spot initial lors du premier crible et donc ne donner lieu qu'à une seule boîte positive. Au départ des résultats d'autoradiographie, 24 clones ont été sélectionnés sur base de l'intensité du spot, de l'exacte correspondance du spot avec une colonie ainsi que sur base du caractère isolé de celle-ci. Ces 24 clones ont été remis en suspension dans 200 μ l de LB 15% glycérol et conservés à -80°C .

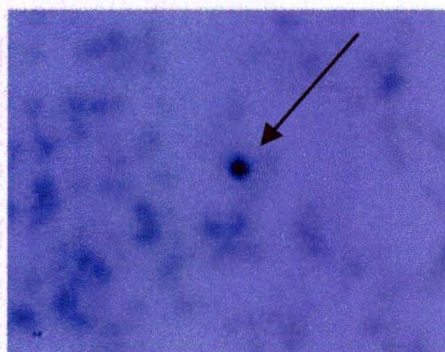
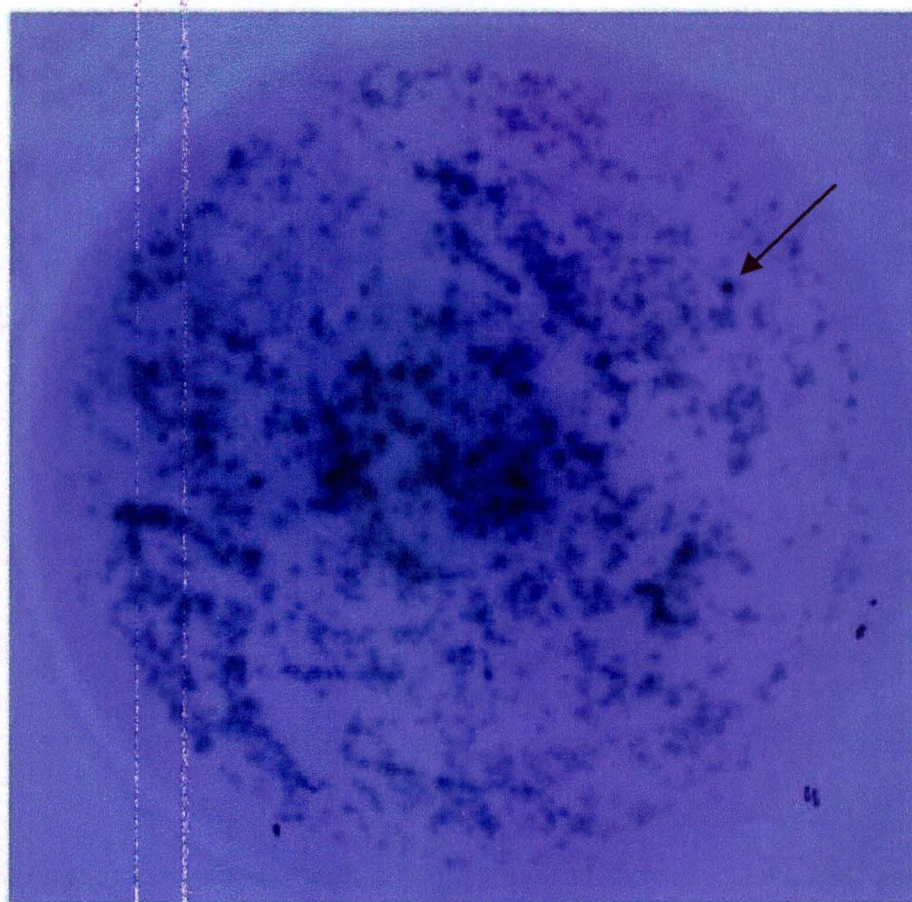


Figure 11. Résultats du premier étalement après criblage au moyen de la sonde Lac
Exemple de spots considérés comme positifs lors du premier étalement
(boîte n°4 avec un des deux candidats sélectionnés sur un total de 10 boîtes).

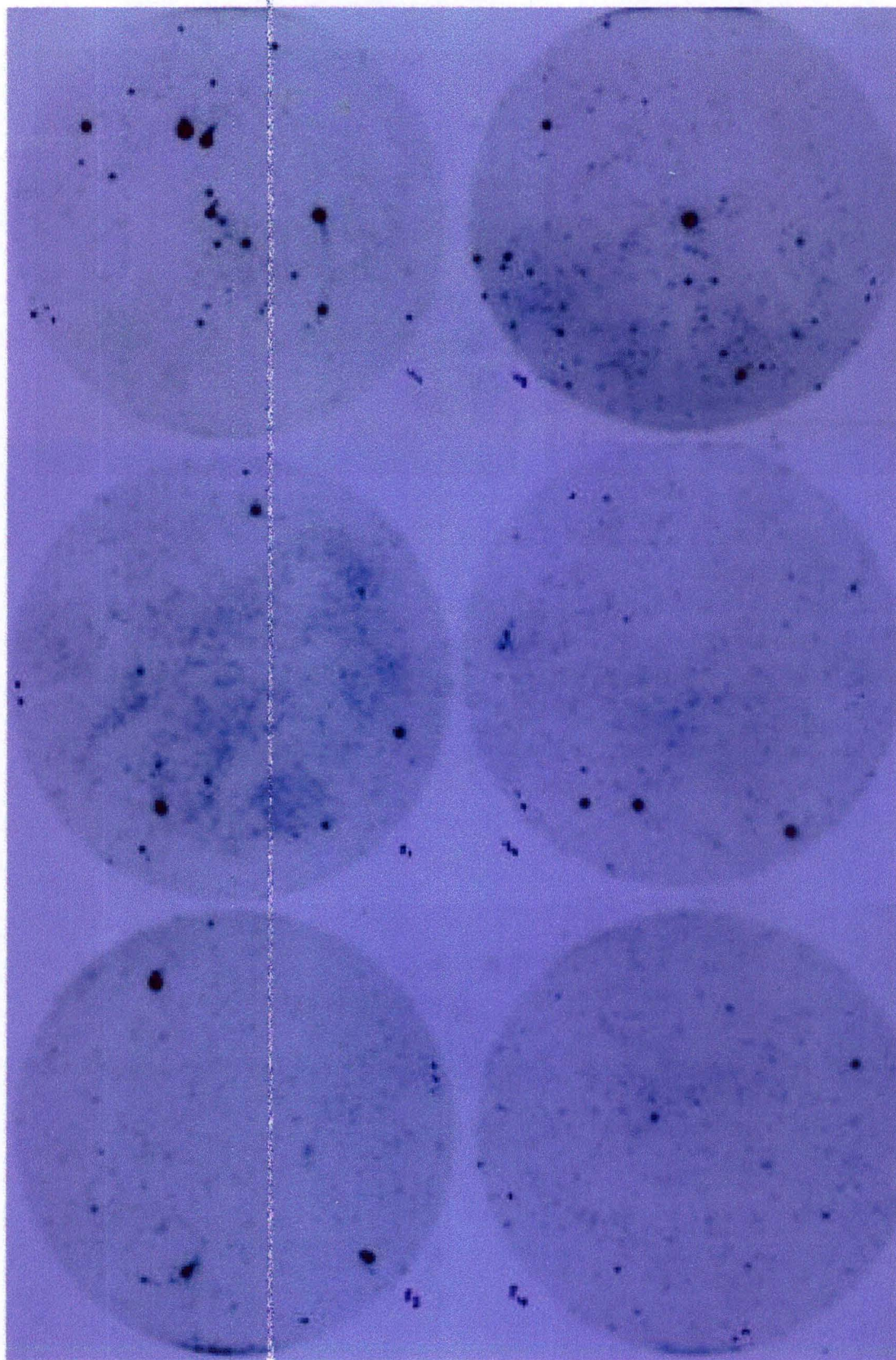


Figure 12 : Résultats du deuxième étalement après crible

Autoradiographies de 6 des 10 filtres obtenus au départ des 10 boîtes sur lesquelles les 10 candidats du premier crible ont été ré-étalés.

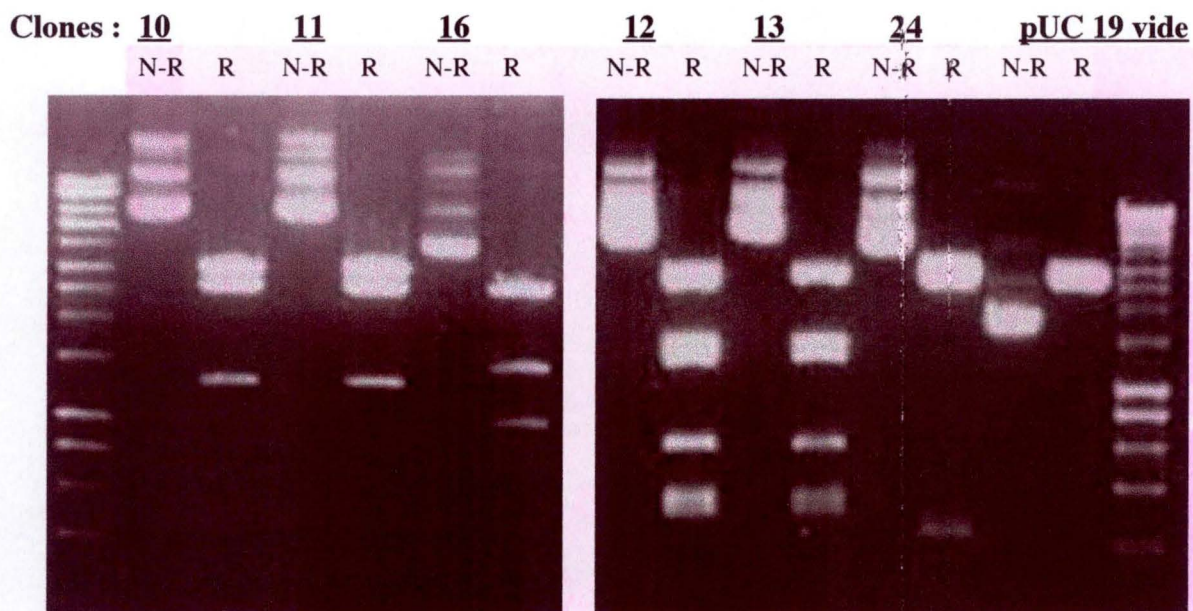


Figure 13 : Profil d'électrophorèse en gel d'agarose 1% des clones blancs criblés lors du deuxième étalement

Les plasmides sont issus d'une midi-préparation d'ADN plasmidique des différentes colonies blanches révélées par le crible du deuxième étalement, les formes non-restreintes (N-R) et restreintes par le couple d'enzymes de restriction *EcoRI* - *Xba* I (R) sont représentés sur les photos.

Le vecteur vide a aussi été restreint et donne 2 fragments, un premier de 2700 pb et un deuxième de 25 pb non-détecté dans le profil de restriction.

II.3.1.2. Caractérisation des 24 clones criblés lors du deuxième étalement

Les 24 clones issus du criblage final ont été ré-étalés sur milieu solide LB, ampicilline, IPTG, Xgal, afin d'isoler les clones et d'éliminer, par test blanc bleu (Matériel et Méthodes, point IV.7), d'éventuels faux positifs correspondant à des plasmides vides. Rappelons en effet qu'environ 30 % de la banque consiste en des colonies avec plasmides sans insert (cfr. point II.2).

Les résultats suivants ont été obtenus:

- 18 des 24 clones apparaissent colorés en bleu et sont effectivement des colonies avec plasmides sans insert.
- Quatre clones (n°10,12,13 et 24) ré-étalés apparaissent colorées en blanc, preuve de la présence d'un insert.
- Deux clones (n°11 et 16) exposent un mélange de colonies blanches et bleues, preuve d'un mélange lors de la réplique, ou lors du prélèvement.

Des préparations d'ADN ont été réalisées sur ces différents clones

A partir d'une colonie pour chacun des 24 clones isolés sur boîte, des minicultures ont été réalisées et l'ADN plasmidique a été purifié. L'ADN plasmidique a été restreint par les enzymes *EcoRI* - *Xba I* (résultats non-montrés). Au départ des 18 clones bleus, aucun insert n'a été mis en évidence, comme attendu. La restriction de l'ADN issu des 6 clones blancs a mis en évidence la présence d'inserts. Des midi-préparations d'ADN plasmidique ont ensuite été réalisées pour chacun des 6 clones. Ces préparations ont été restreintes par les enzymes *EcoRI* - *Xba I* (figure13) Parmi les 6 clones blancs, 4 profils de restriction différents ont été caractérisés. Les clones 10 et 11 présentent les mêmes profils ainsi que les clones 12 et 13. La taille des inserts varie entre 2 et 5 kb et est en accord avec la taille des inserts de la banque.

II.3.1.3. Recherche du gène de laccase au sein des plasmides recombinants

Afin de détecter la présence d'un gène de laccase parmi les 6 clones isolés du deuxième crible de la banque, deux approches ont été utilisées. D'une part par un séquençage réalisé au moyen d'amorces universelles venant s'hybrider chaque côté du site multiple de clonage du vecteur de la banque et d'autre part, une hybridation de la sonde Lac sur les plasmides avec insert selon la méthode utilisée pour le Southern blot (Matériel et Méthodes, point IV. 11 et 12).

Les résultats suivants ont été obtenus :

- Aucune des séquences bordant les 6 inserts ne retrouve d'homologues de laccase lors de la soumission de la séquence au programme BLAST X.
- Aucune hybridation significative (en regard du contrôle positif) n'est apparue au niveau des inserts (figure 14). Cependant le bruit de fond n'est pas négligeable et plus particulièrement, le pUC 19 présente une certaine affinité pour la sonde.

Il apparaît donc qu'aucun des clones isolés lors du deuxième étalement ne contient de plasmides porteur de gène de laccase, ce qui laisse à penser que nous avons en fait détecté des faux positifs lors du deuxième étalement. L'étape du deuxième crible a été répétée au départ des stocks des 24 clones isolés du premier étalement. Aucun signal n'a, dans ce cas, été observé (résultats non montrés). Il semble donc que les deux signaux du premier étalement n'aient, eux aussi, été que des faux positifs. Les raisons de ces résultats décevants demeurent incertaines.

Le criblage de la banque a été recommencé dans son entièreté avec quelques modifications visant à optimiser la méthode. La première optimisation est l'utilisation du test « blanc bleu » lors des étalements successifs de façon à détecter aussitôt d'éventuels faux positifs.

La deuxième optimisation consiste en la réalisation d'un troisième étalement et détection afin de confirmer les signaux apparus lors du deuxième étalement et de cribler de façon plus stricte les colonies positives.

La dernière optimisation a consisté en l'augmentation de la « stringence » par la réalisation d'un troisième lavage (SSC 0,2 X et SDS 0,1%) des membranes après hybridation de la sonde.

II.3.2. Deuxième tentative de clonage

II.3.2.1. Criblage proprement dit

a) La première étape de cette nouvelle tentative de clonage est un nouveau crible de la banque (réalisé sur 10 boîtes LB Amp, IPTG, Xgal pour le test blanc bleu)(Matériel et méthode, point IV.7). Celui-ci a permis d'obtenir des spots d'intensité plus significative que lors du premier criblage de la banque (point II.3.1.1).

Les spots correspondants généralement à des zones de la boîte mère occupée par plusieurs clones, il existe la possibilité de retrouver parmi eux des faux positifs (nommés *faux positifs I* décrivant les clones de coloration bleue auxquels correspondent des spots en autoradiographie). Néanmoins, pour les spots de forte intensité sélectionnés pour le deuxième étalement, des colonies blanches ont été retrouvées, parmi les colonies présentes, sur les

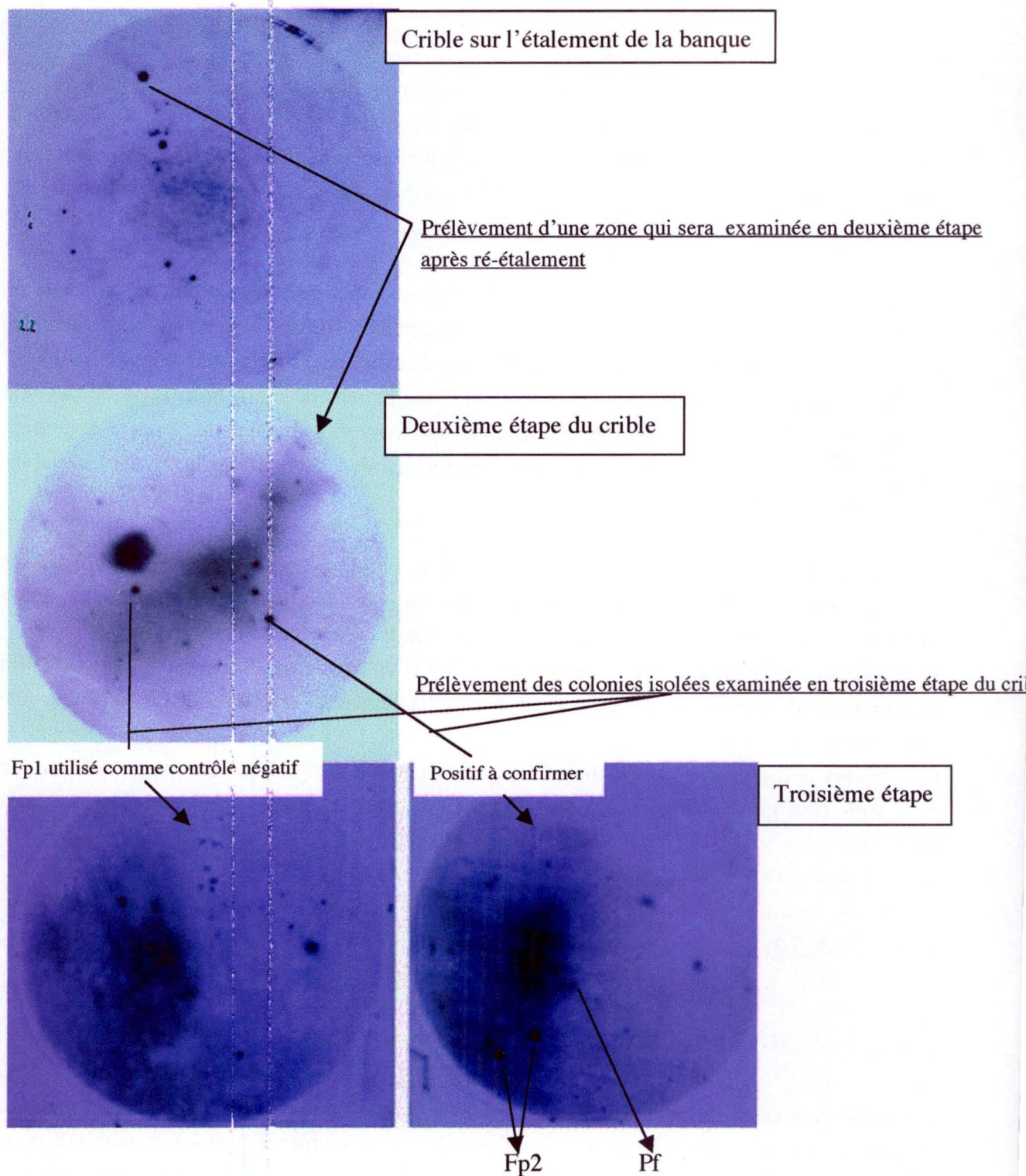


Figure 15 : Schéma récapitulatif de la deuxième tentative de criblage

Exemple illustrant les trois étapes successives pour cribler un clone positif de la banque de départ (détails dans le texte).

Faux positif I (Fp1) = signal de forte intensité correspondant à une colonie bleue.

Faux positif II (Fp2) = signal de forte intensité ne correspondant à aucune colonie.

Positif faible (Pf) = signal de faible intensité correspondant sur la boîte à une colonie blanche.

boîtes mères dans la zone correspondante. 11 zones « positives » ont été prélevées au moyen de « tips » stériles en vue de la deuxième étape du criblage.

b) La deuxième étape du criblage a mis en évidence plusieurs spots. Parmi ces spots, des faux positifs I apparaissent. 9 candidats positifs ont été sélectionnés ainsi que deux faux positifs I lesquels sont destinés à servir de contrôle négatif.

c) Une troisième étape du criblage a été réalisée sur ces 11 clones. Les résultats suivants ont été obtenus.

Pour les deux contrôles négatifs, des spots de faible intensité sont observés ainsi que pour les clones positifs de la deuxième étape. Parmi ceux-ci, des faux positifs sont retrouvés, comme précédemment, soit qu'ils ne correspondent à aucune colonie (nommés faux positifs II), soit qu'ils correspondent à une colonie bleue (faux positifs I).

Un exemple explicatif est repris à la figure 15.

II.3.2.2. Caractérisation des candidats

Pour déterminer la présence de gène de laccase parmi les colonies blanches correspondant à des spots, 7 candidats ont été sélectionnés (selon les mêmes critères qu'au point II.3.1.1) ainsi qu'une colonie bleue servant de contrôle négatif. Un test d'hybridation diagnostique avec la sonde Lac a été réalisé sur l'ADN extrait de 7 clones positifs (Matériel et Méthodes, point IV.12). Après miniculture, l'ADN plasmidique de ces candidats a été préparé et restreint par *EcoRI* – *Xba* I. Après migration sur gel d'agarose et transfert sur membrane, les ADN ont été hybridés avec la sonde Lac.

Les résultats sont présentés à la figure 16. Aucune piste ne révèle d'hybridation ; les candidats ne correspondent donc pas à la sonde spécifique.

II.3.3. Conclusions d'ensemble des deux tentatives de clonage

Au cours des deux tentatives de clonage, les candidats identifiés par hybridation sur colonies avec la sonde Lac s'avèrent être des faux positifs. Les signaux d'hybridation en autoradiographie ne correspondent à aucune colonie ou à une colonie avec un plasmide sans insert (ce que le test blanc bleu permet de vérifier) ou avec un insert non-homologue. Le test « blanc bleu » utilisé lors du deuxième criblage a effectivement permis d'identifier un grand nombre de faux positifs. Toutefois, il demeure qu'aucun des signaux positifs ne révèle de plasmides porteurs de gène de laccase. La matrice utilisée pourrait être la cible de cette hybridation non spécifique.

Les modifications adoptées au criblage lors de la deuxième tentative de clonage n'ont pas permis de résoudre ce problème.

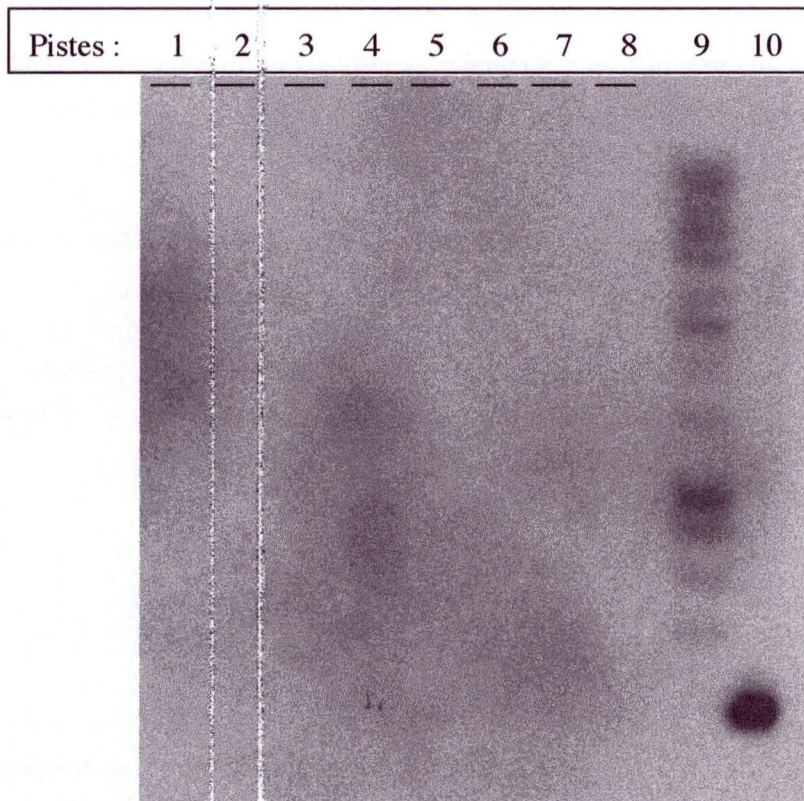


Figure 16 : Hybridation de la sonde Lac sur les plasmides restreints, obtenus lors de la troisième étape de la deuxième tentative de clonage

Piste 1 = Plasmide sans insert servant de contrôle négatif

Piste 2 à 8 = Positifs faibles

Piste 9 = Hyper ladder

Piste 10 = pAG 1 utilisé comme contrôle positif

CONCLUSION GENERALE ET DISCUSSION

Le clonage de gène de laccase de *Scytalidium acidophilum* (champignon extrémophile) a été entrepris. Une banque d'ADN génomique de ce champignon a été utilisée pour le clonage par sondage nucléotidique. Sur base d'alignement de séquences de laccases, nous avons cherché à définir des amorces susceptibles d'amplifier un fragment d'ADN propre au gène résident de *S. acidophilum* afin de l'utiliser comme sonde autologue.

Les résultats obtenus par les méthodes d'alignements de séquences protéiques de laccase ont permis les observations suivantes:

- une approche globale qui utilise les séquences de laccases de différents embranchements d'organismes, majoritairement de plantes supérieures et de champignons, ne permet pas de mettre en évidence des régions suffisamment conservées pour être utilisées comme point de départ à la détermination d'amorces nucléotidiques. Cette constatation peut avoir un lien direct avec les divergences entre ces oxydases chez les plantes supérieures et les champignons.

- une l'alignement réalisé exclusivement sur les laccases de champignons permet la détermination de 10 boîtes dont 4 sont fortement conservées. Ces 4 boîtes correspondent aux quatre sites de liaison au cuivre de l'enzyme. Elles peuvent être utilisées pour la détermination d'amorces nucléotidiques spécifiques aux laccases de champignons.

La boîte « a » a été choisie pour définir 9 amorces 5' (Lac 5'.1 à 9). La boîte b correspondant a été choisie pour définir 12 amorces 3' (Lac 3'.1 à 12). Le choix des couples d'amorces nucléotidiques 5'-3' en vue d'une amplification PCR a été déterminé par les paires de séquences en acides aminés présentes au sein d'une même séquence de laccase. 29 couples ont ainsi été sélectionnés. Ces 29 couples d'amorces pourraient trouver des applications futures pour cloner un fragment de laccase au départ de l'ADN génomique d'autres champignons.

La réalisation de PCR en gradient de température s'est avérée efficace pour la recherche du couple d'amorces du champignon étudié.

Un amplicon de x pb, correspondant à la taille théorique sans intron du fragment de laccase, a été obtenu. Sur base de la séquence de ce fragment, un peptide de 49 a.a. a été déduit lequel présente 62% d'identité et 76% de similarité avec une laccase de XXXX. Ce fragment correspond donc à un fragment d'ADN d'un gène de laccase dont la présence est ainsi attestée dans le génome de *S. acidophilum*.

Aucun intron n'a été mis en évidence entre les boîtes a et b chez *S. acidophilum*, la même absence se retrouve chez *S. thermophilum* appartenant au même genre.

L'obtention d'un fragment de gène de laccase prouve la validité de la méthode utilisée, et appuie la généralisation de l'utilisation des amorces à d'autres champignons.

Ce fragment de x pb d'un gène de laccase a été utilisé comme sonde (« sonde Lac ») pour réaliser un Southern-blot sur de l'ADN génomique de *S. acidophilum* et ensuite pour cribler la banque d'ADN génomique du champignon.

La réalisation du Southern-blot a permis de confirmer la présence d'un gène de laccase chez ce champignon et de préciser que ce gène n'est présent qu'en une seule copie pour cette souche. De plus, la sonde utilisée a été confirmée comme autologue à l'ADN génomique de *S. acidophilum* et donc potentiellement fonctionnelle pour le criblage de la banque d'ADN génomique de ce champignon.

Néanmoins, le criblage de la banque d'ADN génomique s'est, quant à lui, avéré être un échec.

La première tentative de clonage d'un gène de laccase au départ de la banque s'est déroulé en deux étapes. Un premier crible qui a permis d'isoler deux clones positifs et un deuxième crible qui a mis en évidence 24 clones s'hybridant avec la sonde. La caractérisation des plasmides (pAG) de ces clones a mené à l'observation, soit de l'absence d'insert, soit de clones possédant un insert sans homologie avec le gène ou partie du gène de laccase. Cette conclusion ressort du séquençage des extrémités des inserts et du test d'hybridation de la sonde Lac sur les plasmides purifiés et restreints. L'explication de cet échec peut être dû à des problèmes d'isolement des clones, du contrôle de la stringence et d'hybridation non-spécifiques.

Un deuxième essai a été réalisé moyennant les modifications suivantes :

- les colonies sont étalées sur milieux Xgal-IPTG afin de déterminer directement la présence d'inserts et donc d'éliminer de futurs faux positifs.
- après hybridation avec la sonde Lac, les membranes sont soumises à un lavage supplémentaire (SSC 0,2 X et SDS 0,1%), plus « stringent » qu'au premier criblage.
- après la première étape du criblage, les colonies s'hybridant avec la sonde ont été purifiées par deux cribles successifs (deuxième crible et troisième crible).

Les signaux ou « spots » obtenus en autoradiographie sont intenses à la première et deuxième étape de ce criblage. Cependant, à la deuxième étape, certains d'entre eux se sont révélés comme faux positifs ne correspondant sur la boîte mère à aucune colonie ou à une colonie bleue (c'est-à-dire avec un plasmide sans insert). Ce problème de faux positifs se répète à la troisième étape et en outre, l'intensité des spots positifs est très atténuée. Aucun fragment de laccase n'a été mis en évidence par hybridation de la sonde Lac sur plasmides purifiés.

En conclusion, le problème majeur des deux essais de clonage par criblages serait donc lié à la faible taille de la sonde qui induirait des hybridations non spécifiques ou autres interférences avec les différents types d'ADN des colonies. Une solution pourrait être la détermination d'une sonde de plus grande taille (c'est-à-dire couvrant une région ou diverses régions ayant

ensemble une taille nucléotidique plus grande), permettant une hybridation plus spécifique. Les alignements réalisés n'offrent pas cette possibilité car les séquences alignées présentent trop de divergence. Une diminution de la diversité de séquences à aligner serait nécessaire et pour cela il faudrait s'adresser à des champignons « phylogénétiquement » plus proche de *S. acidophilum*.

Une autre approche à tenter, consisterait à n'utiliser qu'une seule séquence de laccase retrouvée chez un champignon proche de *S. acidophilum* afin de déterminer une sonde hétérologue de taille plus conséquente et la tester, préalablement au crible de la banque, sur l'ADN génomique du champignon par « Southern blot ».

MATERIEL ET METHODES

I. Milieux de culture et antibiotiques

I.1. Milieu Luria Bertani (LB)

a. LB liquide :

-hydrolysate de caséine (peptone)	1%
-NaCl	0,5%
-Yeast extract	0,5%

b. LB solide :

Ajouter de l'agar	1,5%
-------------------	------

Après préparation des milieux, ceux-ci sont autoclavés 20min. à 120°C.

I.2. Milieu SOC

- Yeast extract	0.5%
- Peptone	2%
- KCL	2.5 mM
- NaCl	10 mM
- MgCl ₂	10 mM
- MgSO ₄	10 mM
- Glucose	20 mM

Après préparation des milieux, ceux-ci sont autoclavés 20min. à 120°C.

I.3. Milieu pour *Scytalidium acidophilum*

Composition de base pour 1l de milieu :

- Solution de sels :	
H ₂ SO ₄ 10N	100 ml
KOH	2,5 g
NaOH	2 g
FeCl ₃	0,1 g
MgCO ₃	25 g
NH ₄ OH 32% (320g/l)	5 ml

H ₃ PO ₄	3,3 ml
*Solution d'éléments en traces	2 ml

- Ajuster la solution de sels à pH 2 avec du NaOH 15 N
- Ajouter 3 g de Yeast extract à la solution de sels
- Porter à 1 l avec de l'eau distillée
- Autoclaver la solution
- Ajouter stérilement 20 g de glucose comme source de carbone.

*Solution d'éléments en traces

H ₃ BO ₃	0,12 g
Na ₂ MoO ₄ .2 H ₂ O	0,5 g
CuSO ₄ .5 H ₂ O	0,8 g
MnCl ₂ .4 H ₂ O	0,15 g

Porter à 1 l avec de l'eau distillée

I.4. Antibiotiques

1. Ampicilline : concentration finale 100 µg/ml
2. Streptomycine : concentration finale 100 µg/ml

II. Souches et plasmides

II.1. Souche bactérienne : *E. coli* DH10B

Cette souche est utilisée pour la transformation par divers plasmides ou produits de ligation.

Son génotype est le suivant :

80Δ*lacZ*Δ*M15* Δ*lacX74* *recA1* *endA1* *rpsL*.

Cette souche possède les caractéristiques suivantes :

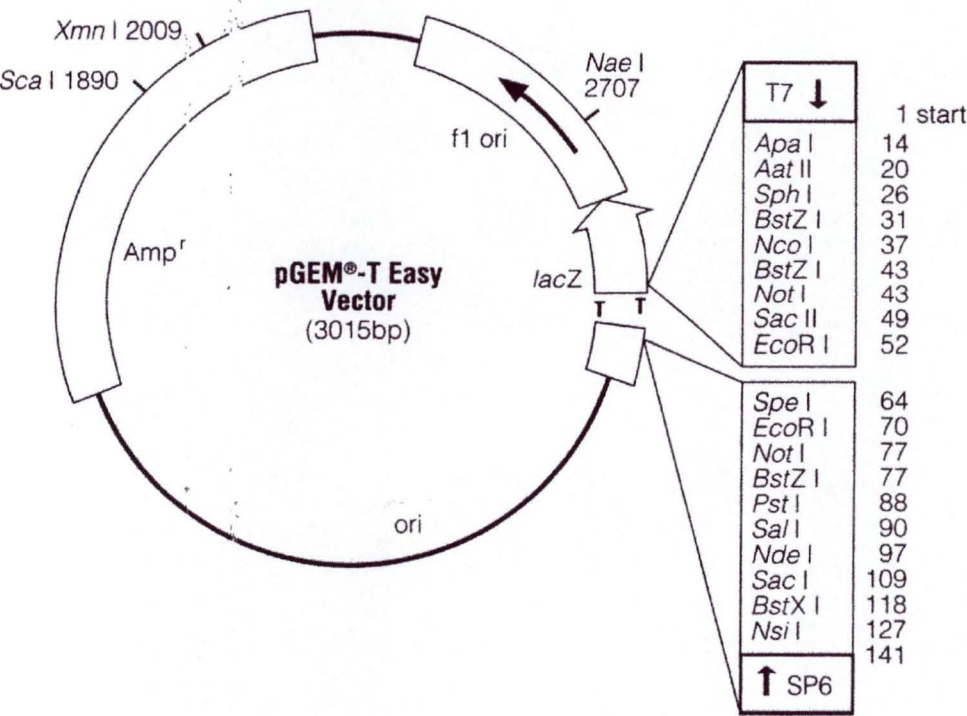
- *recA1* réduit la recombinaison au millième de son taux normal, minimisant ainsi la recombinaison entre ADN endogène et exogène,
- *endA1* améliore le rendement et la qualité des préparations d'ADN plasmidique en diminuant le taux d'endonucléase,
- Δ*lac* est une délétion de l'opéron lactose qui la rend incapable de métaboliser le lactose.
- *rpsL* code pour la résistance à la streptomycine.

Cette souche est utilisée pour l'amplification plasmidique. Elle est mise en culture à 37°C dans du milieu de Luria-Bertani (LB). Dans le cas d'une sélection d'un plasmide ampicilline résistant, de l'ampicilline est ajoutée au milieu LB à une concentration de 100 µg/ml.

II.2. Plasmides

II.2.1. pGEM-TEasy (Promega)

Ce plasmide est conçu pour le clonage de fragments PCR. Il est linéarisé au niveau du Site Multiple de Clonage (SMC) et porte une base T protrudante, ce qui permet de liguer avec une grande efficacité un fragment PCR. En effet, l'enzyme ADN polymérase Biotools ajoute une base A aux extrémités 3' des fragments PCR. Ces fragments sont donc compatibles avec les extrémités du vecteur pGEM-T easy. De plus, ce dernier ne peut pas se liguer sur lui-même. Le site de clonage est situé dans le gène codant pour l'α-peptide de la β-galactosidase, ce qui permet de détecter les plasmides recombinants avec le test blanc-bleu (point IV.7). Le plasmide pGEM-T porte le gène de résistance à l'ampicilline. Ce gène sert de marqueur de sélection.



II.2.2. pUC 19 (In Vitro gene)

Ce plasmide a été utilisé comme vecteur pour la réalisation de la banque d'ADN génomique de *Scytalidium acidophilum*.

La restriction utilisée pour la libération des inserts contenus dans le vecteur a été réalisée au moyen du couple d'enzymes *EcoRI* – *XbaI*.

III. Techniques relatives au traitement de séquences protéiques

III.1. Banque de données non redondante

Les recherches effectuées tout au long de ce travail ont été réalisées dans une banque non redondante : la banque "nr" formée au NCBI. Elle reprend toutes les CDS (séquences codantes) traduites de Genbank, ainsi que les séquences non redondantes des banques de données PDB, SWISS PROT, PIR et PRF. Elle contient actuellement environ 1 000 000 de séquences protéiques.

III.2. Programmes de recherche en banques de données

III.2.1. BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)

BLAST (Altschul, Gish, *et al.* 1990) est un programme rapide de recherche de séquences similaires à la séquence d'intérêt dans une banque de données. En plus des séquences qu'il trouve, il donne un alignement local païré entre chacune des séquences homologues et la séquence d'intérêt.

Ce programme fournit également un score représentant l'identité entre deux séquences. Plus ce score est élevé, plus la similarité est grande. Par exemple, pour un score inférieur à 150, le pourcentage d'identité est inférieur à 20%

III.2.2. PURGE

PURGE est un programme qui utilise une stratégie itérative pour extraire des séquences homologues non redondantes d'un ensemble de séquences (Neuwald, Liu *et al.* 1995).

Cet algorithme effectue une recherche transitive pour déterminer quelles sont les séquences reliées entre elles. Si une recherche païrée trouve que deux séquences A et B sont similaires, et qu'une seconde recherche trouve que B est relié à une troisième séquence, C, alors, A et C peuvent être reliées. A la suite d'une série de recherches par BLAST, toutes les interactions de ce type sont déduites de façon itérative jusqu'à ce qu'aucune nouvelle séquence ne soit trouvée. Pour éliminer ou garder des séquences, PURGE utilise le score donné par BLAST. Si ce score est supérieur au score fixé par l'utilisateur, les séquences sont éliminées.

Au cours du traitement du grand nombre de séquences de laccases, PURGE a été utilisé pour extraire un ensemble de séquences trop similaires.

III.3. Programmes d'alignement multiple.

III.3.1. CLUSTAL W

Clustal W (Thompson, Higgins *et al.* 1994) est un programme d'alignement multiple global de séquences très utilisé.

À partir des séquences trouvées lors d'une recherche en base de données, il calcule simultanément un ensemble d'alignements pairés en comparant chaque séquence, dans leur intégralité, à toutes les autres séquences. Suite à ces comparaisons, une matrice de distance qui reflète la similarité est calculée. Cette matrice permet la construction d'un arbre phylogénétique (une représentation graphique des relations évolutives présumées entre groupes d'organismes). Il sert de base pour la construction de l'alignement. Ce dernier débute par l'alignement pairé des deux séquences les plus similaires, puis un nouvel alignement est opéré avec la séquence la plus similaire et ainsi de suite.

Si un nombre conséquent de séquences doit être ajouté, l'addition de *gaps* est inévitable, pour insérer les séquences divergentes dans l'alignement. Dans le cadre de ce mémoire, ce programme nous a permis de visualiser les séquences divergentes qui empêchent la détermination de régions conservées, et de les soustraire.

III.3.2. MATCH-BOX

Match-Box (Depiereux, Baudoux *et al.* 1997) est un logiciel d'alignement multiple local, c'est-à-dire qu'il aligne des séquences par fragments similaires afin d'y déterminer les régions prédites comme étant structurellement conservées. Il comporte deux parties:

- EXPLORE permet de détecter si des séquences sont similaires et, de ce fait, s'il est adéquat de les aligner ultérieurement. Une analyse permet de visualiser des groupes de séquences similaires.
- ALIGN est conçu pour réaliser l'alignement des séquences. Il est composé de trois algorithmes, à savoir le *scanning*, le *matching* et le *screening*. Le *scanning* effectue une analyse des séquences de manière à déterminer les meilleurs paramètres qui doivent être utilisés dans la suite du programme. Le *matching* effectue toutes les comparaisons pairées de segments de séquences pour constituer des boîtes de segments similaires. Dans le *screening*, les boîtes *a priori* les meilleures sont alors sélectionnées pour constituer l'alignement final.

Match-Box fournit un coefficient de confiance compris entre 1 et 9 (par ordre décroissant de certitude). Cet indice est proportionnel aux taux de faux positifs observés lors de l'alignement

de familles de séquences dont les alignements de référence sont connus. La confiance est un élément important pour déterminer si les zones ont été correctement alignées. Ceci représente un avantage qu'il est pertinent de relever. Un coefficient de confiance inférieure à 5 dans le cas des alignements réalisés, implique une probabilité inférieure à 0.5 d'obtenir un faux positif.

IV. Techniques relatives à l'ADN

IV.1. Extraction de l'ADN génomique de champignon

L'extraction d'ADN génomique de *Scytalidium acidophilum* est réalisée au départ d'une culture liquide de 100 ml et utilise le kit « Wizard genomic DNA purification kit » (Promega).

Mode opératoire

- Filtrer la culture et broyer les mycelliums au moyen d'azote liquide afin d'obtenir de la poudre.
- Transférer 40 mg de cette poudre dans un tube eppendorf.
- Ajouter 600 µl de solution de lyse et vortexer 1 à 3 sec.
- Incuber à 65°C pendant 15 min.
- Ajouter 3 µl de solution Rnase au lysat cellulaire et mélanger en inversant les tubes 2 à 5 fois. Incuber 15 min à 37°C. Laisser 5 min à température ambiante.
- Ajouter 200 µl de solution de précipitation des protéines et vortexer vigoureusement pendant 20 sec.
- Centrifuger pendant 3 min à 13000 rpm. Les protéines précipitent et forment un culot
- Prélever le surnageant contenant l'ADN et déposer dans un nouveau tube contenant 600 µl d'isopropanol et mélanger par inversion
- Centrifuger à 13000 rpm pendant 1 min à température ambiante.
- Décantier le surnageant. Ajouter 600 µl d'éthanol à 70% et inverser plusieurs fois pour laver l'ADN. Centrifuger 1 min.
- Aspirer délicatement l'éthanol et laisser sécher une quinzaine de min.
- Ajouter 100 µl de solution de réhydratation et incuber l'ADN 1h à 65°C en mélangeant périodiquement.
- Conserver l'ADN à 4°C

Les préparations sont vérifiées sur gel (2µl dans 8µl d'eau) et testées par restriction ainsi que par une amplification PCR de contrôle.

IV.2. Amplification d'ADN par PCR

La description de PCR classique est présentée parallèlement à celle des PCR à gradient de température utilisant, dans le cadre de ce travail, des amorces oligonucléotidiques dégénérées. Le principe de ces deux types de PCR est, en effet, le même.

L'ADN doit être dénaturé pour permettre l'hybridation des amorces. Des amorces oligonucléotidiques complémentaires de séquences se trouvant de chaque côté de la région-cible, s'hybrident l'une au brin "sens" et l'autre au brin "anti-sens". Une ADN polymérase thermostable, telle que la Taq (Biotools) est alors utilisée pour synthétiser à partir de l'extrémité 3'-OH de chaque amorce un brin d'ADN complémentaire. Un cycle consiste en 3 étapes :

dénaturation des brins d'ADN

hybridation des amorces

élongation (synthèse d'un brin d'ADN complémentaire).

En répétant ce cycle, on augmente de façon exponentielle le nombre de copies du fragment cible. La température de « melting » ou T_m des amorces se calcule de la façon suivante (pour des oligonucléotides d'une taille inférieure à 20 bases) : 4°C sont comptabilisés pour les bases G et C et 2°C pour les bases A et T : $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$.

Les amorces dégénérées et les combinaisons utilisées lors des PCR à gradient de température sont décrites au point I.2.2 du chapitre résultats.

Les autres amorces utilisées sont :

Pour le séquençage des pAG1,2,3,4 et5 (vecteur pGEM-T easy)

- amont : 5'-GTTTTCCTCCAGTCACGACG-3'

- aval : 5'-GGAAACAGTATGACCATG-3'

Pour la synthèse de la sonde à partir de l'amplicon de x pb contenu dans le pAG1

- amont : 5'-NNN...-3' (LacS5')

- aval : 5'-NNN...-3' (LacS3')

Pour le séquençage des plasmides des clones de la banque (vecteur pUC 19)

- amont : 5'-GTTTTCCTCCAGTCACGACG-3'

- aval : 5'-GGAAACAGTATGACCATG-3'

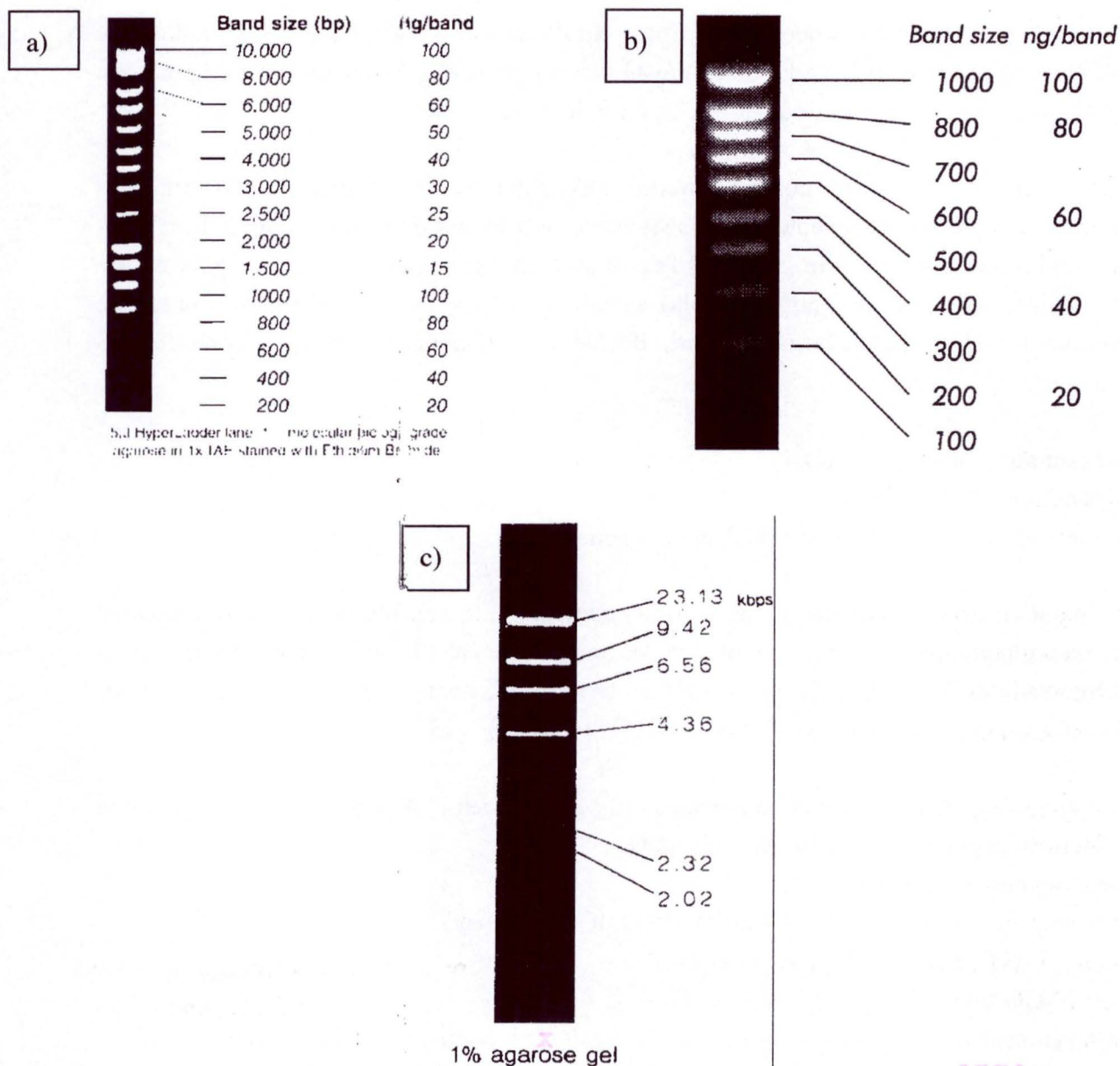


Figure 1 : Marqueurs de poids moléculaire

a) Marqueur de taille hyperladder (Bioline)

b) Marqueur de taille Smart Ladder SF (Eurogentec)

c) Marqueur de taille ADN phage λ coupé par *Hind* III (Eurogentec)

a. Mode opératoire

Mélange de réaction réalisé dans un microtube:

- Tampon d'ADN polymérase 10X à une concentration finale 1X
- dNTP à une concentration finale de 0,2 mM
- Primer 5' à une concentration finale de 0,2 μ M
- Primer 3' à une concentration finale de 0,2 μ M
- Polymérase à raison de 1,245 U/ml au final
- ADN cible
- Porter à 50 μ l avec de l'eau distillée stérile

Pour les PCR à gradient de température, des amorces dégénérées ont été utilisées. De par la dégénérescence de celles-ci, la concentration des amorces a été augmentée (50 μ M).

b. Programme utilisé pour les amplifications PCR classiques et à gradient de température

Pour la PCR classique :

- Dénaturation de 3 minutes à 95°C.
- 30 cycles d'amplification divisé en 3 étapes:
 - 30 sec. à 95°C pour la dénaturation
 - 30 sec. à 50°C pour l'hybridation
 - 30 sec. à 72°C pour la polymérisation
- Elongation finale de 8 minutes à 72°C

Le programme utilisé pour les PCR à gradient de température ne varie du précédent que par l'étape d'hybridation qui dans ce cas est graduée en 6 températures indépendantes comprises entre 60 et 40°C (60, 55, 49, 45, 42 et 40°C).

IV.3. Electrophorèse en gel d'agarose

L'électrophorèse en gel d'agarose sépare les fragments d'ADN en fonction de leur taille. Le pourcentage d'agarose à utiliser sera inversement proportionnel aux tailles des fragments à séparer. La taille des fragments est estimée en faisant co-migrer des fragments d'ADN de taille connue. Nous avons utilisé comme marqueurs de taille l'ADN du phage λ coupé par *Hind* III (Eurogentec), l'Hyperladder (Bioline) et le Smart Ladder SF (« Small fragment ») commercialisé par la firme Eurogentec. Ces trois marqueurs de taille de l'ADN sont représentés à la figure 1

Les fragments d'ADN sont visualisés au moyen du bromure d'éthidium. Celui-ci se lie à l'ADN bicaténaire en s'intercalant entre les bases de la double hélice. Etant fluorescent, le

bromure d'éthidium marque l'ADN et celui-ci est visible sous illumination UV. Il faut noter que la fluorescence d'un fragment d'ADN est proportionnelle à la quantité d'ADN présente. En connaissant la quantité d'ADN des marqueurs de taille, on peut estimer la quantité d'ADN du fragment par comparaison de l'intensité de la fluorescence.

a. Mode opératoire

- Immerger le gel dans une cuve d'Electrophorèse remplie de tampon TAE, auquel on a ajouté quelques μ l d'une solution de bromure d'éthidium
- Préparer les échantillons en ajoutant 1/10 de solution d'alourdisseur
- Déposer les échantillons dans les puits et effectuer la migration au voltage désiré (5V/cm)
- Visualiser le gel sous UV (transilluminateur de longueur d'onde 302 nm)

b. Solution, tampons et matériel

1. Solution de bromure d'éthidium :

- 2 μ g/ml

2. Solution d'alourdisseur (10x) :

- glycerol 50%
- EDTA 100 mM
- SDS 1%
- Bleu de bromophénol (pour les tailles supérieures à 200 pb) ou méthyl orange (pour les tailles inférieures à 200 pb)

3. Tampon TAE (50 fois concentré) :

- Tris-HCl, pH 8,0 40 mM
- EDTA 0,002M
- Acide acétique glacial 57,1 ml/litre

IV.4. Extraction de l'ADN à partir de gel

Kit d'extraction d'ADN (MBI Fermentas)

Cette technique va permettre d'extraire la bande d'ADN d'intérêt à partir du gel d'agarose dans lequel il a migré. Dans un premier temps le gel est préparé et les échantillons sont chargés dans les pistes. Après migration et trempage dans une solution de bromure d'éthidium, le gel est révélé une fraction de seconde sur le banc U.V. Cette brève révélation permet de repérer la localisation de la bande d'ADN d'intérêt. Cette bande est alors découpée du gel et l'ADN en est extrait. Cette technique permet de se débarrasser des fragments de restriction inutiles ou partiellement restreints. Elle est également utilisée pour éliminer les enzymes de restriction, de ligation, ou autres.

a. Mode opératoire

- Exciser le plus petit morceau possible de gel contenant la bande d'ADN avec une lame de scalpel.
- Ajouter 3 volumes de « binding solution » pour 1 volume d'agarose
- Incuber 5 minutes à 55°C pour dissoudre l'agarose
- Ajouter 5 µl de « silicate powder suspension » ou matrice (billes adsorbant l'ADN)
- Vortexer pour resuspendre
- Incuber 5 min à 55°C. Vortexer toutes les 2 min pour garder la matrice en suspension
- Centrifuger 5 secondes à 13000 rpm, enlever le surnageant
- Ajouter 500 µl de tampon de lavage froid, vortexer et centrifuger 5 secondes, enlever le surnageant
- Répéter cette étape de lavage trois fois. A chaque étape resuspendre complètement le culot
- Au dernier lavage, enlever le surnageant et recentrifuger à nouveau le culot pour enlever le reste de surnageant
- Laisser le culot sécher 10 à 15 min (si nécessaire)
- Eluer l'ADN en resuspendant le culot dans un aliquot d'eau stérile (11 µl) et incuber 5 min à 55°C
- Centrifuger quelques sec et récupérer le surnageant dans un nouveau tube
- Répéter l'élution
- Déposer une petite quantité d'éluat sur gel d'agarose pour vérifier et stocker à -20°C

b. Solutions

Composition du Binding buffer:

- guanidine-thiocyanate 3M
- Tris-HCl 10mM, pH 6,6
- Ethanol 5%

Composition du Wash buffer:

- NaCl 20 mM
- Tris-HCl 2 mM, pH 7,5
- Ajouter 40 ml d'éthanol à 200ml du tampon avant utilisation.

IV.5. Réaction de ligation

Pour lier de manière covalente deux fragments d'ADN, on utilise l'ADN ligase du phage T4 (Roche, 1U/ μ l). Elle catalyse la formation de liens phosphodiester entre le phosphate 5' d'une extrémité d'ADN et l'hydroxyl 3' d'une extrémité proche. L'enzyme, pour être active, nécessite la présence d'ATP et d'ions Mg^{2+} .

Mode opératoire

- Mélanger dans un tube Eppendorf les fragments d'ADN à lier
- 1/10^{ème} du volume final de tampon de ligation 10x
- Le nombre d'unités de ligase nécessaire (dépendant de la quantité d'ADN)
- Compléter avec de l'eau distillée stérile
- Incuber, à 16°C une nuit pour des extrémités cohésives et minimum 3 heures à température ambiante pour des bouts francs.

IV.6. Transformations de bactéries $CaCl_2$ compétentes

La transformation de bactéries compétentes consiste à faire entrer de l'ADN exogène (dans ce cas, un plasmide) dans une bactérie.

Pour cette transformation, la paroi bactérienne est rendue perméable à l'ADN: la bactérie est alors dite compétente.

Des bactéries Gram-négatives *E. coli* en début de phase exponentielle de croissance sont rendues artificiellement compétentes par passage dans une solution hypotonique de chlorure de calcium ($CaCl_2$). Celui-ci déstabilise la paroi de la bactérie, qui gonfle alors en prenant l'aspect d'un sphéroplaste. L'ADN plasmidique ajouté forme avec le calcium un complexe résistant aux désoxyribonucléases. Ce complexe est supposé adhérer à la bactérie. Les bactéries sont soumises à un choc thermique qui permet au complexe de rentrer dans la cellule. Un temps d'incubation en milieu riche non sélectif permet aux bactéries de régénérer une paroi normale et aux gènes de résistance introduits de s'exprimer. Les transformants sont ensuite isolés par culture sur boîte de milieu sélectif.

a) Préparation de cellules $CaCl_2$ compétentes

- Ensemencer 100 ml de LB+ streptomycine à partir d'une préculture de cellules DH10B. Incuber à 37°C sous agitation jusqu'à une absorbance d'environ 0,3 à 550 nm (début de la phase exponentielle)
- Arrêter la croissance en refroidissant la culture sur glace pendant 10 minutes

- Centrifuger la culture 15 minutes à 3000 rpm à 4°C. Eliminer le surnageant et resuspendre le culot dans un volume de CaCl_2 50mM, équivalent à la moitié du volume initial.
- centrifuger 15 minutes à 3000 rpm à 4°C
- Eliminer le surnageant et resuspendre le culot dans un volume de solution froide en CaCl_2 50mM glycérol 15% équivalent au dixième du volume initial
- Aliquoter la suspension en eppendorfs et stocker à -80°C

b) Transformations de bactéries CaCl_2 compétentes

- À 185 µl de cellules compétentes, ajouter environ 10 µl de mélange de ligation ou 10 à 100 ng d'ADN
- Déposer 40 minutes sur glace
- Réaliser un choc thermique de 2 minutes à 42°C
- Ajouter 900 µl de LB liquide
- Incuber de 30 min. à 1 heure à 37°C
- Etaler sur boîtes de milieu sélectif et incuber une nuit à 37°C

IV.7. Test blanc bleu

Les éléments génétiques portés par la souche DH10B (Δlac) ne lui permettent pas d'avoir une activité β -galactosidase normale. Une complémentation intragénique avec un plasmide apportant LacI (fragment non opérationnel du gène de régulation de l'opéron lactose) et un fragment du gène *lacZ* (partie N-terminale de la β -galactosidase) peuvent néanmoins se faire. Lorsque cette complémentation est effectuée, la bactérie possède une β -galactosidase fonctionnelle. Celle-ci est mise en évidence par son action sur le X-gal (20µg/ml dilué 1000 fois dans le milieu) substrat chromogène qui donne un composé bleu lorsqu'il est clivé. Si un insert est cloné dans le gène LacZ du plasmide, il n'y aura pas de complémentation et le X-gal ne sera pas clivé. La bactérie et la colonie résultante resteront blanches.

Ce test est utilisé pour différencier visuellement les colonies transformées par un plasmide avec insert (blanches) des colonies transformées par un plasmide sans insert (bleues)

L'IPTG ajouté dans le milieu de culture permettra l'expression de *lacZ*.

IV.8. Extraction d'ADN plasmidique

IV.8.1. Minipréparation d'ADN plasmidique d'*E.coli*

Une miniprep comprend 5 étapes : la lyse alcaline des bactéries, la précipitation des protéines et des débris cellulaires, la précipitation de l'ADN plasmidique, le lavage de l'ADN plasmidique et sa resuspension.

Mode opératoire

- Ensemencer 5ml de milieu liquide (LB + antibiotiques) avec une colonie isolée
- Incuber la culture liquide une nuit à 37°C sous forte agitation
- Centrifuger 1.5ml de la culture dans un eppendorf (pendant 5 minutes à 12500 rpm) et éliminer le milieu de culture
- Resuspendre le culot bactérien dans 300 µl de S1 (RNase A 100 µg/ml, Tris-HCL 50 mM pH 8.0, EDTA 10 mM, à conserver à 4°C)
- Ajouter 300 µl de S2 (NaOH 200 mM, SDS 1%, à conserver à température ambiante) et mélanger doucement en retournant, incuber 5 minutes à température ambiante
- Ajouter 300 µl de S3 (KAc 3.0 M pH 5,5, à conserver à 4°C) et mélanger doucement en retournant, incuber 5 minutes sur glace
- Centrifuger 15 minutes à 4°C (à 14000 rpm) et récupérer le surnageant
- Précipiter l'ADN en ajoutant 0.7 volume d'isopropanol, homogénéiser
- Centrifuger 15 minutes à 4°C (à 12500 rpm), éliminer le surnageant
- Laver l'ADN, en ajoutant 300 µl d'éthanol 70% et centrifuger 5 minutes à 4°C (à 12500 rpm). Éliminer prudemment l'éthanol
- Sécher le culot d'ADN
- Resuspendre dans 20 µl d'H₂O distillée stérile

IV.8.2. Midipréparation d'ADN plasmidique d'*E.coli*

La midipréparation d'ADN comprend les mêmes étapes que la minipréparation d'ADN, mais permet d'obtenir une plus grande quantité d'ADN, plus purifié. Cette technique comprend l'utilisation d'une colonne échangeuse d'anions (kit commercial Nucleobond AX 100) qui permet de préparer l'ADN plasmidique en éliminant les protéines, l'ARN et l'ADN génomique.

Mode opératoire

- Préculture : ensemencer 5 ml de milieu liquide (LB+antibiotiques) avec une colonie bactérienne
- Ensemencer avec 25 à 100 ml de milieu liquide (LB+antibiotiques) avec un volume de préculture représentant 1/100e du volume final
- Incuber la culture liquide une nuit à 37°C sous forte agitation
- Culoter la culture à 3000 rpm pendant 15 minutes, éliminer le surnageant
- Resuspendre le culot dans 4 ml de S1
- Ajouter 4ml de S2 et mélanger doucement, laisser 5 minutes à température ambiante
- Ajouter 4 ml de S3 et agiter doucement, laisser 5 minutes sur glace

- Centrifuger 2,5 minutes à 12000 rpm (Sorvall, rotor SS34) et à 4°C. Récupérer le surnageant
- Equilibrer la colonne avec 2 ml de tampon N2 (NaCl 50 mM, Ethanol 15%, Triton X-100 0,15%)
- Déposer le surnageant sur la colonne équilibrée
- Laver la colonne avec 2 X 5 ml de tampon N3 (pH7,0 : NaCl 1M, MOPS 50 mM, Ethanol 15%)
- Eluer l'ADN plasmidique avec 5 ml de tampon N5 (NaCl 1,25 M, Tris-Hcl 50 mM, Ethanol 15%)
- Précipiter l'ADN avec 0.7 volume d'isopropanol
- Centrifuger 15 minutes à 4°C (à 12000 rpm) et éliminer le surnageant
- Laver à l'éthanol 70% et centrifuger 5 minutes à 4°C (à 12000 rpm). Eliminer le surnageant
- Sécher le culot
- Resuspendre dans 100µl d'H₂O distillée stérile

IV.9. Restriction de l'ADN

Le clivage de l'ADN bicaténaire à des sites précis se fait par des endonucléases de restriction qui reconnaissent de courtes séquences palindromiques de 4 à 6 paires de bases.

a. Mode opératoire

- x µl d'ADN à restreindre en suspension dans de l'eau distillée
- 1/10^{ème} de tampon de restriction 10x
- l'enzyme de restriction: au maximum 1/10^{ème} du volume final. Entre 2 et 10 unités d'enzyme par µg d'ADN (1 unité correspondant à la quantité d'enzyme nécessaire pour restreindre complètement 1 µg d'ADN du phage λ en 1 heure à 37°C dans un volume de 25 µl)
- Amener au volume final avec de l'eau distillée stérile
- Incuber au minimum 1 heure à la température optimale pour l'enzyme (souvent 37°C). L'enzyme peut être soit inactivée par chauffage (15 à 20 minutes à 65 °C) si l'enzyme est thermosensible, soit éliminée par une extraction phénol/chloroforme

b. Enzymes utilisées :

- EcoRI : G↓AATTC
- HindIII : A↓AGCTT
- XbaI : T↓CTAGA
- XhoI : C↓TCGAG

IV.10. Séquençage d'ADN

Pour séquencer des fragments d'ADN nous avons utilisé le Kit ABI PRISM dye terminator (Perkin Elmer). Le principe appliqué dans ce kit est un cycle séquentiel avec assimilation de didéoxyribonucléotides marqués avec des molécules fluorescentes. Chacun des 4 didéoxyribonucléotides possède son marquage propre (sa longueur d'onde d'émission), ce qui rend possible la lecture à partir d'une seule réaction. Ce type de réaction permet par la suite l'utilisation d'un séquenceur automatique. La réaction de séquençage est basée sur le principe de Sanger (1977). L'incorporation des didéoxyribonucléotides arrête la réaction de polymérisation ce qui permet d'obtenir une population de brins tronqués qui représentent la séquence d'ADN

Mode opératoire

- La concentration en ADN matrice doit être de 100 à 200 ng si c'est un fragment monocaténaire, de 500 à 1000 ng s'il est bicaténaire et 100 ng de produit PCR. Lorsqu'on utilise un produit PCR, une purification préalable est nécessaire, elle permet d'éliminer les amorces et les nucléotides qui interagiraient avec la réaction de séquençage
- La quantité d'amorce doit être de 3.2 pM
- 8 μ l de « terminator ready reaction mix » sont ajoutés ensuite. Cette solution contient les 4 didéoxynucléotides marqués, du Tris-HCl (pH 9), du $MgCl_2$, une pyrophosphatase stable, l'ampliTaq ADN polymérase FS, dITP, dATP, dTTP, dCTP. Le dITP remplace le dGTP ce qui évite la compression des bandes lors de l'électrophorèse. L'ampliTaq ADN polymérase FS remplace la Taq polymérase classique car elle est plus efficace pour l'incorporation de nucléotides marqués
- Les temps de réaction préalablement réglés sur l'appareil PCR sont ceux appliqués en générale
- Après la réaction, il est nécessaire de purifier l'ADN car de nombreux nucléotides marqués n'ont pas été incorporés dans la réaction de polymérisation. Leur présence pourrait perturber l'électrophorèse dans le séquenceur. Pour cette purification nous avons suivi le protocole suivant :
 - Ajouter 2 μ l de NaAc 3M pH4.8
 - Ajouter 50 μ l d' EtOH 95%
 - Mettre 10 ' sur glace
 - Centrifuger 20' dans une minifuge à vitesse maximale
 - Eliminer le surnageant
 - Ajouter 250 μ l d'EtOH 70% à 4°C
 - Centrifuger pendant 20 minutes
 - Eliminer l'EtOH, laisser sécher à l'air

- Les produits sont séparés suivant leur taille par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence d'urée. Le résultat du gel sera détecté par un système optique relié à un ordinateur (ABI PRISM 377).

IV.11. Analyse de l'ADN restreint par « Southern blot »

Cette technique est utilisée pour l'identification et la localisation de séquences spécifiques d'ADN. Le « Southern blot » tire parti de la propriété de l'ADN à former des doubles brins stables en relation avec leur complémentarité. Une sonde marquée est utilisée pour l'hybridation sur les séquences d'intérêts.

L'ADN génomique est digéré par différentes enzymes de restriction et les fragments d'ADN bicaténaux sont séparés par une électrophorèse en gel d'agarose de façon à séparer les fragments selon leur taille.

Les fragments d'ADN sont visualisés grâce aux UV. Ils sont dénaturés par incubation du gel dans une solution d'hydroxyde de sodium. Le gel est ensuite immergé dans une solution de neutralisation. Les fragments d'ADN sont transférés sur une membrane de nylon dans une solution de haute concentration saline au moyen d'un transfert par capillarité.

Comme cette étape respecte la distribution des fragments dans le gel, la membrane de nylon constitue une réplique du gel d'agarose. L'ADN est ensuite fixé de manière covalente par exposition aux UV.

L'hybridation de la sonde marquée au $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ à l'ADN dénaturé restreint et fixé sur la membrane de nylon s'effectue dans des conditions de stringences déterminées. L'excès de sonde non fixée à la membrane est éliminé par lavage. L'hybridation de la sonde est par la suite révélée par autoradiographie de la membrane.

IV.11.1. Restriction de l'ADN et Electrophorèse en gel d'agarose

L'ADN génomique est complètement digéré par différentes enzymes de restriction. Les enzymes qui ont été utilisées sont *EcoRI* (40 U/ μl), *HindIII* (40 U/ μl), *Xba I* (40 U/ μl) et *Xho I* (40 U/ μl).

La restriction est vérifiée et l'ADN quantifié en déposant un dixième de la restriction sur gel d'agarose 1%. Pour le « Southern blot », on charge environ 500 ng à 1 μg de la restriction sur un grand gel d'agarose 0,8%. Pour assurer une bonne séparation des bandes, on laisse migrer de 3 à 4 heures à un faible voltage (70 volts). Des photos du gel sont réalisées après migration avec une latte graduée comme référence pour déterminer ultérieurement les distances de migration.

Le marqueur de taille HyperLadder (Bioline) est utilisé pour évaluer la taille des fragments de restriction.

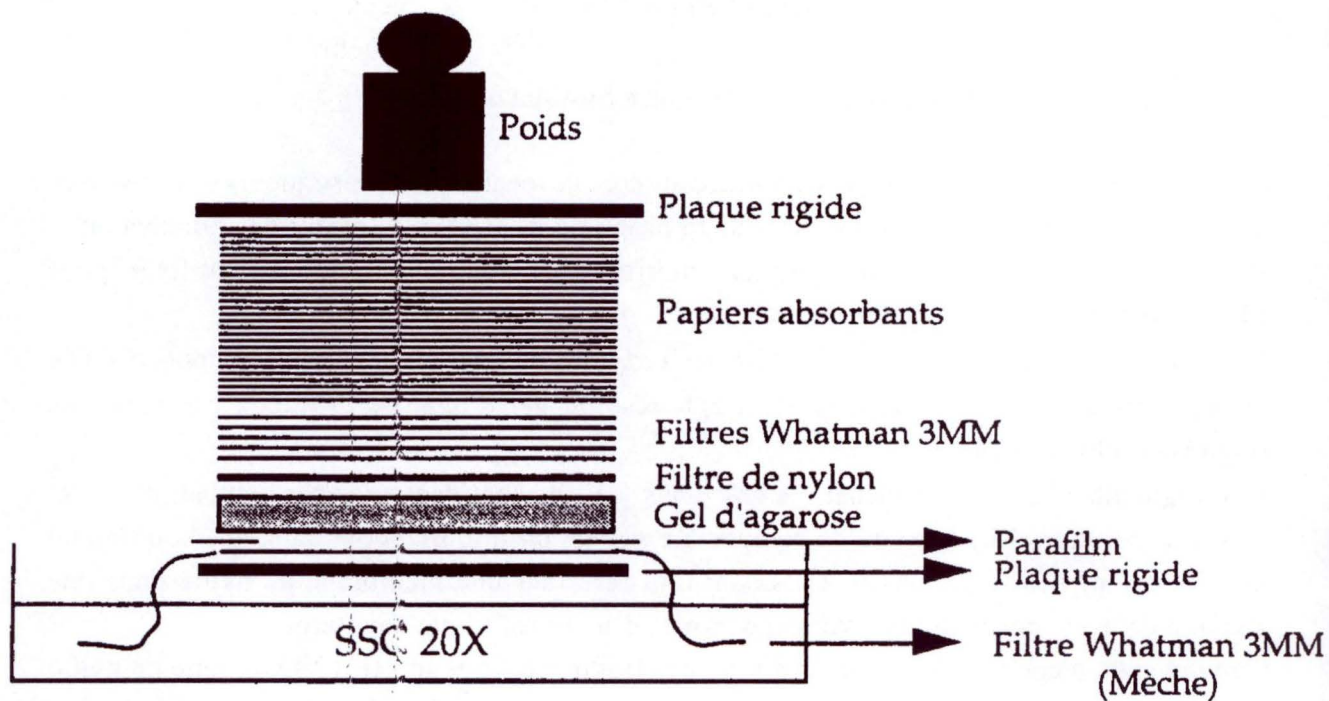


Figure 2 : Schéma du montage utilisé pour le transfert d'ADN sur membrane

IV.11.2. Dénaturation et neutralisation

Le gel est placé pendant deux fois 15 minutes dans la solution de dénaturation sous agitation. Cette étape assure la dénaturation des deux brins de l'ADN et permettra l'hybridation de la sonde marquée. Le gel est ensuite immergé dans une solution de neutralisation deux fois 15 minutes sous faible agitation.

Solution de dénaturation :

- NaCl 1 M
- NaOH 0.5 M

Solution de neutralisation :

- NaCl 1.5 M
- Tris HCl 0.5 M pH 7.2
- EDTA 1 mM

IV.11.3. Transfert et immobilisation

Le transfert se réalise par capillarité pendant une nuit en présence d'un tampon de transfert SSC 20X par l'utilisation du montage décrit à la figure 2.

Solution SSC 20X : - NaCl 3 M

- Na₂ citrate 0.3 M

Par la suite, le transfert est vérifié par exposition de la membrane aux UV.

L'ADN est fixé sur la membrane en exposant celle-ci aux UV pendant une minute.

IV.11.4. Séchage et pré-hybridation de la membrane

Le séchage de la membrane s'effectue dans une étuve à 80°C pendant une heure.

Lors de la pré-hybridation, la membrane est immergée dans une solution de pré-hybridation 2 heures à 68°C. Cette étape permet de réduire le bruit de fond par l'hybridation non spécifique de l'ADN de thymus de veau.

Solution de pré-hybridation :

- | | |
|-----------------------------|---------|
| - Denhard 50X : | 5 ml |
| - SSC 20X : | 12.5 ml |
| - SDS 10 % | 0.5 ml |
| - ADN de thymus 100 µg / ml | 3.3 ml |
| - H ₂ O | 28.7 ml |

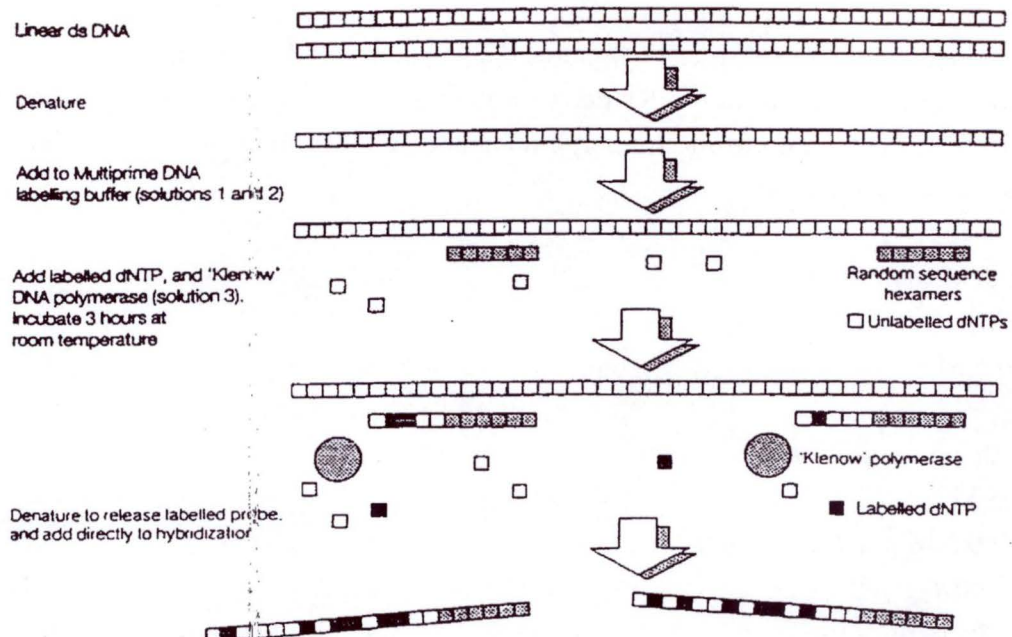


Figure 3 :Méthode de synthèse de sondes marquées par amorçage aléatoire ou « random priming »

L'ADN de thymus de veau est dénaturé dans de l'eau bouillante pendant 10 minutes et incubé sur glace avant d'être ajouté à la solution.

IV.11.5. Marquage et hybridation de la sonde

Le fragment de gène utilisé comme sonde a été amplifié par PCR au départ du plasmide pAG1 et d'amorces spécifiques. Après purification, ce produit PCR sert à son tour de matrice pour synthétiser la sonde marquée.

Pour la synthèse de la sonde marquée au $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$, nous utilisons le kit Rad prime label system de Invitrogen et les $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP (10 mCi/ ml, 3000 Ci/ mmol) de Amersham Pharmacia Biotech.

La synthèse de cette sonde repose sur une fixation d'amorces aléatoires octamères, celles-ci sont anticomplémentaires de certaines portions de l'ADN matrice (ici le produit PCR purifié) et vont pouvoir initier la synthèse de la sonde par le fragment de Klenow de l'ADN polymérase II. Le marquage radioactif est réalisé grâce à l'incorporation de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ dont le groupement phosphate α est remplacé par un phosphate radioactif. Suite à cette synthèse, des fragments de taille variable seront obtenus, ceux-ci pourront s'hybrider avec le brin anticomplémentaire de l'ADN (figure 3).

Mode opératoire :

- Placer 25 ng d'ADN du produit PCR purifié (ADN matrice) dans un volume 10 μl d'eau distillée stérile.
- Faire bouillir 10 minutes et conserver l'ADN matrice sur glace
- Ajouter 1 μl de dATP, dGTP, dTTP (500mM) et 20 μl d'amorces aléatoires (solution 2.5x)
- Ajouter 5 μl d' $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$
- Porter le volume à 49 μl avec de l'eau distillée stérile, et mélanger
- Ajouter 1 μl de la polymérase Klenow
- Incuber 10 min. à 37 °C

La sonde est ajoutée à la solution de préhybridation et la membrane. L'ensemble est placé à 68 °C sous agitation pendant une nuit.

IV.11.6. Lavages

Après hybridation, le mélange préhybridation-sonde peut être récupéré et conservé à -20 °C pour être réutilisé. La membrane est lavée deux fois, pendant 10 minutes, avec du SSC 2X, SDS 0.1%. Des lavages plus stringents en SSC 0,2X, SDS 0.1% ont également été réalisés.

Mode opératoire

a. Etalement de la banque

Les colonies poussent sur milieu LB Amp et sont étalées de façon homogène au moyen d'un râteau. Afin de représenter la banque dans son entièreté, 10 boîtes de Pétri (14 cm de diamètre) sont utilisées à une densité de colonies d'environ 10^4 .

Une série de dilutions est réalisée préalablement afin de déterminer la dilution adéquate de la banque correspondant à une densité cellulaire d'environ 10^4 colonies. Sur base de ces dilutions, la banque est étalée sur boîte avec une densité voulue.

- étaler sur dix boîtes LB Amp, 100 μ l de la solution bactérienne de dilution déterminée.
- placer les boîtes à 37°C une nuit.

b. Transfert

- déposer de manière homogène un filtre NY Amp sur la boîte de Pétri et réaliser des repères afin de pouvoir repositionner le filtre sur la boîte pour retrouver les colonies,
- reprendre le filtre et le déposer sur une boîte de pétri LB Amp vierge avec les colonies dirigées vers le haut de telle sorte qu'elles poussent sur le filtre,
- incubé à 37°C quelques heures jusqu'à ce que les colonies aient atteint une taille adéquate.

c. Lyse des colonies

La lyse des colonies se réalise en quelques étapes simples :

- déposer la membrane sur un papier filtre saturé de solution de dénaturation pendant 7 minutes,
- déposer la membrane sur un papier filtre saturé de solution de neutralisation pendant 7 minutes,
- déposer la membrane sur un papier filtre saturé de SSC 20X pendant 3 minutes,
- placer la membrane entre deux papiers filtres secs et passer avec un rouleau afin d'éliminer tous les déchets cellulaires qui resteront fixés au papier filtre supérieur.

d. Séchage de la membrane

Cette étape permet de fixer de manière covalente l'ADN à la membrane. Elle s'effectue dans l'étuve à 80°C pendant une demi-heure à deux heures.

IV.11.7. Détection et révélation

La membrane est ensuite placée, sous farde plastique, dans une cassette au contact d'un film autoradiographique. La cassette est maintenue à -80°C pendant au moins cinq heures. Ensuite, le film autoradiographique est immergé dans une solution de révélation pendant 10-15 secondes. Une fois les bandes révélées, le film est rincé à l'eau, puis trempé dans une solution de fixation.

IV.12. Hybridation de sonde sur plasmide restreint

Cette méthode est basée sur la méthode de « Southern blot » (point précédent).

La seule variante consiste en ce que l'ADN génomique est dans ce cas remplacé par de l'ADN plasmidique à tester.

L'ADN plasmidique est restreint de façon à libérer les inserts contenus par le plasmide au moyen des enzymes adéquates.

IV.13. Crible d'une banque d'ADN génomique

Cette méthode a été utilisée pour le crible d'une banque d'ADN génomique de *Scytalidium acidophilum*. Elle utilise le principe de l'hybridation anticcomplémentaire d'acides nucléiques afin de déterminer quelle(s) colonie(s) bactérienne(s) contiennent le plasmide porteur du gène recherché, dans notre cas un gène de laccase.

Principe :

Après avoir étalé la banque sur boîtes de Pétri, des répliques sur filtre de nylon sont réalisées. Les colonies transférées sont lysées et l'ADN est fixé de façon covalente après chauffage à 80°C en étuve. Les filtres sont mis en présence d'une sonde marquée capable de s'hybrider avec l'ADN complémentaire d'intérêt. Après élimination de l'excès de sonde par lavages successifs, la localisation de la sonde liée de manière spécifique est examinée par autoradiographie. La localisation sur le filtre de la sonde liée correspond à la place sur la boîte de Pétri d'une colonie contenant le clone désiré. Une culture de cette cellule permettra de réaliser des tests diagnostiques divers.

e. Préhybridation et hybridation

Toutes les étapes suivantes allant de la préhybridation à l'hybridation sont identiques à celles réalisées dans le cadre du Southern Blot (IV.12) .

Remarque : pour le premier criblage, seuls les lavages en SSC 2X, SDS 01% ont été réalisés.

Pour le deuxième criblage, un lavage supplémentaire en SSC 0,2X, SDS 01% a été réalisé.

BIBLIOGRAPHIE

Altschul, S. F., W. Gish, et al. (1990). "Basic local alignment search tool." J Mol Biol **215**(3): 403-10.

Boudet, A. M. (1999). "Lignins and lignification: Selected issues." Plant Physiological Biochemistry **38**(1/2): 81-96.

Buchanan, Gruissem, et al. (2000). *Physiobiologists*. A.S.o.P.: 1286-1299.

Calvus, J. (1996). Etablissement d'une banque génomique d'ADNc du champignon "extrémophile" *Scytalidium acidophilum* en vue de l'exploitation d'enzymes hyperstables. Ath, Institut Provincial D'enseignement Supérieur Agricole et Technique: 90.

Call, H. P. and I. Mücke (1997). "History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator systems (Lignozym-process)." Journal of Biotechnology **53**: 163-202.

Campbell et al. (1995). *Biologie*. DeBoeck : 143-149.

Depiereux, E., G. Baudoux, et al. (1997). "Match-Box_server: a multiple sequence alignment tool placing emphasis on reliability." Comput Appl Biosci **13**(3): 249-56.

Ducros, V., A. M. Brzozowski, et al. (1998). "Crystal structure of the type-2 Cu depleted laccase from *Coprinus ciliarius* at 2.2 Å resolution." Nat. Struct. Biol. **5**(4): 310-6.

Dumonceaux, T., K. Bartholomew, et al. (2001). "Cellobiose dehydrogenase is essential for wood invasion and nonessential for kraft pulp delignification by *Trametes versicolor*." Enzyme and microbial Technology **29**: 478-489.

Fabbrini, M., C. Galli, et al. (2002). "Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase." Journal of Molecular Catalysis **16**: 231-240.

Griffith, G. W., S. D. Martinelli, et al. (1994). Phenoloxidases. *Aspergillus nidulans* : 50 years on. S. D. Martinelli and J. R. Kinghorn. Amsterdam, Elsevier Science Publishers. **29**: 763-788.

Guarro, J., GeneJ, et al. (1999). "Developments in fungal taxonomy." Clin. Microbiol. Rev. **12**(3): 454-500.

Johannes, C. and A. Majcherczyk (2000). "Natural Mediators in the Oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Laccase Mediators Systems." Applied and Environmental Microbiology **66**(2): 524-528.

Madigan, M. T., J. M. Martinko, et al. (2000). Brock, Biology of Microorganisms. Upper Saddle River, New Jersey.

Neuwald, A. F., J. S. Liu, et al. (1995). "Gibbs motif sampling : detection of bacterial outer membrane protein repeats." Protein Sci. **4**(8): 1618-1632.

Pelmont, J. (1989). Enzyms. Grenoble, Presse Universitaire de Grenoble.

Raghukumar, C., T. M. D'souza, et al. (1999). "Lignin-Modifying Enzymes of *Flavon flavus*, a Basidiomycete isolated from a Coastal Marine Environment." Applied and Environmental Microbiology **65**(5): 2103-2109.

Roberts, S. A., A. Weichsel, et al. (2002). "Crystal structure and electron transfer kinetic of CueO, a multicopper oxidase required for copper homeostasis in *Escherichia coli*." PNAS **99**(5): 2766-2771.

Sigler, L. and J. W. Carmichael (1973). "A new acidophilic *Scytalidium*." Can. J. Microbiol. **20**: 267-269.

Thompson, J. D., D. G. Higgins, et al. (1994). "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice." Nucleic Acids Res **22**(22): 4673-80.

Torres, J. and M. T. Wilson (1999). "The reactions of copper proteins with nitric oxide." Biochim. Biophys. Acta **1411**(2-3): 310-22.

[bin/cas/tree/store/bbabioc/cas_sub/browse/browse.cgi?year=1999&volume=1411&issue=2-3&aid=44735](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ncbi/cas/tree/store/bbabioc/cas_sub/browse/browse.cgi?year=1999&volume=1411&issue=2-3&aid=44735).

Xu, F., J. J. Kulys, et al. (2000). "Redox Chemistry in Laccase-Catalysed Oxidation of N-Hydroxy Compounds." Applied and Environmental Microbiology **66**(5): 2052-2056.

Zouari, H., M. Labat, et al. (2002). "Degradation of 4-chlorophenol by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* in free and immobilized cultures." Biomesure Technology **84**: 145-150.

ANNEXES

ANNEXE 1: ALIGNEMENT MATCH BOX COMPLET DES 21 SEQUENCES DE LACCASES DE CHAMPIGNONS
ET DES VEGETAUX

DONNEES CONFIDENTIELLES

ANNEXE 2: ALIGNEMENT MATCH BOX COMPLET DES 27 SEQUENCES DE LACCASES DE CHAMPIGNONS

DONNEES CONFIDENTIELLES